

Aus dem Institut für Klinische Molekularbiologie
(Direktoren: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Prof. Dr. Philip Rosenstiel,
Prof. Dr. Andre Franke)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung des klassischen und des Trans-Signalweges von Interleukin-6 in der intestinalen epithelialen Wundheilung

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von:

Alexandra Le Mao (geb. Breuer)

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Institut für Klinische Molekularbiologie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Krautwald, Klinik für Innere Medizin IV
mit den Schwerpunkten Nieren- und Hochdruckkrankheiten

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2021

Zum Druck genehmigt: 03.03.2021

Vorsitzende des Ausschusses für Promotion: Prof. Dr. Franziska Theilig

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1 Einleitung.....	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1 Veränderungen der Immunantwort.....	2
1.1.2 Genetische und nicht-genetische Ursachen	3
1.1.3 Endoplasmatischer Retikulumsstress.....	4
1.1.4 Herabgesetzte intestinale epitheliale Wundheilung	6
1.1.5 Therapiestrategien.....	8
1.2 Interleukin-6.....	8
1.2.1 <i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> des Zytokins Interleukin-6	9
1.2.2 Die Rolle der Jak/STAT-Kinasen	12
1.2.3 Hemmung der IL-6-Signalwege	13
1.3 Zielsetzung	16
2 Methoden	18
2.1 Zellkulturmethoden.....	18
2.1.1 Kultivierung verwendeter Zelllinien	18
2.1.2 Bestimmung der Zelldichte und Aussaat der Zellen	19
2.1.3 Zellernte.....	20
2.1.4 Mauslinie.....	21
2.1.5 Isolierung muriner Dünndarm-Krypten.....	21
2.1.6 Kultivierung von Dünndarm-Organoiden	22
2.1.7 Isolierung muriner intestinaler Epithelzellen	22
2.1.8 Wundheilungs-Assay.....	23
2.2 Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1 Isolierung von genomischer DNA	24
2.2.2 Isolierung von RNA.....	25
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.2.4 cDNA-Synthese	26
2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion.....	26
2.3 Proteinchemische Methoden	27
2.3.1 Herstellung von denaturierenden Proteinlysaten.....	27
2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine	28
2.3.3 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page).....	28
2.3.4 Western Blot	29

2.3.5	Antikörper-Inkubation und Detektion der Proteine.....	30
2.3.6	Membran- <i>Stripping</i> und Protein-Ladekontrolle.....	30
3	Ergebnisse.....	32
3.1	IL-6-Signalwege in humanen Kolonkarzinomzelllinien	32
3.1.1	<i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> aktivieren zeitabhängig den Jak/STAT3-Signalweg.....	32
3.1.2	Epitheliale Wundheilung wird nur durch <i>Trans-Signaling</i> verstärkt	34
3.1.3	Inhibition von IL-6 vermindert die endogen induzierte Wundheilung nicht	37
3.1.4	Sgp130Fc reduziert den Einfluss von hIL-6 auf die Regeneration der Wundfläche	40
3.1.5	Inhibition von STAT3 hat einen geringen Einfluss auf das regenerative Potenzial von <i>Trans-Signaling</i>	40
3.2	IL-6-Signalwege in intestinalen Epithelzellen von IL-6R^{ΔIEC}	43
3.2.1	Nur <i>Trans-Signaling</i> aktiviert STAT3 in intestinalen Epithelzellen.....	43
3.2.2	IL-6 induziert keine STAT3-Antwort in intestinalen Organoiden	45
3.3	Bedeutung der IL-6-Signalwege für ER-Stress und Wundheilung.....	47
3.3.1	<i>Trans-Signaling</i> aktiviert die <i>Unfolded Protein Response</i>	48
3.3.2	Persistierender ER-Stress vermindert die epitheliale Wundheilung	50
3.3.3	Sgp130Fc vermindert die wachstumsschädigende Wirkung von hIL-6 und Tunicamycin.....	55
4	Besprechung der Ergebnisse	57
4.1	<i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> in humanen Kolonkarzinomzelllinien	57
4.1.1	Humane Kolonkarzinomzelllinien sind durch den klassischen IL-6-Weg aktivierbar.....	57
4.1.2	Epitheliale Wundheilung wird nur über <i>Trans-Signaling</i> vermittelt	58
4.1.3	<i>Trans-Signaling</i> beeinflusst die Migration und Proliferation	59
4.1.4	Biologische Effekte der IL-6-Signalwege können spezifisch gehemmt werden	61
4.1.5	<i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> aktivieren den Jak/STAT-Signalweg.....	62
4.2	<i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> in primären intestinalen Epithelzellen	65
4.2.1	<i>Classic Signaling</i> spielt eine untergeordnete Rolle im intestinalen Epithel	65
4.2.2	Beide IL-6-Signalwege sind miteinander verzahnt	66
4.3	Limitationen des regenerativen Einflusses von <i>Trans-Signaling</i>	67
4.3.1	<i>Trans-Signaling</i> induziert ER-Stress.....	67
4.3.2	ER-Stress beeinflusst die intestinale Wundheilung	68
4.4	Fazit.....	70

4.4.1	Der regenerative Einfluss von <i>Trans-Signaling</i> im intestinalen Epithel ist kontextabhängig	70
4.4.2	Sgp130Fc hemmt beide Wirkungsprofile von <i>Trans-Signaling</i>	71
4.4.3	<i>Classic Signaling</i> spielt gegenüber <i>Trans-Signaling</i> eine untergeordnete Rolle im intestinalen Epithel	71
4.4.4	Aussagen über Reaktionsabläufe in-vivo sind nur begrenzt möglich	72
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	74
7	Anhang.....	89
7.1.1	Liste verwendeter Abkürzungen	89
7.1.2	Liste der Abbildungen	92
7.1.3	Liste der Tabellen	93
7.1.4	Puffer und Lösungen	94
7.1.5	Zellmedien	94
7.1.6	Mauslinie.....	95
7.1.7	Chemikalien	95
7.1.8	Stimulanzien und Inhibitoren	96
7.1.9	Antikörper	97
7.1.10	Kits.....	97
7.1.11	Oligonukleotide	98
7.1.12	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	99
7.2	Danksagung	101
7.3	Lebenslauf.....	102

1 Einleitung

Eine wichtige Aufgabe für die Abwehr von Krankheitserregern im menschlichen Körper übernimmt die Darmschleimhaut und allen voran das intestinale Epithel, das eine mechanische Barriere zwischen den eigenen Körperzellen und dem Darmlumen bildet [1, 2]. Dadurch schützt es den Körper einerseits vor dem schädigenden Einfluss von pathogenen und kommensalen Darmbakterien sowie endogenen Noxen und reguliert gleichzeitig die Resorption von wichtigen Nahrungsbestandteilen [3-5]. Als selektiv permeable Barriere stellt es sicher, dass bestimmte Stoffe passieren können, während andere zurückgehalten werden [6]. Eine Beschädigung dieser physikalischen Grenzschicht führt zu einer Entzündungsreaktion, da Darmbakterien und andere toxische Stoffe in die tiefer liegenden Darmgewebeschichten gelangen. Als Gegenregulation reagiert der Körper mit der Aktivierung von Zellen des Immunsystems [3]. Um die natürliche Homöostase aufrechtzuerhalten und eine zu starke und zeitlich unbegrenzte Immunreaktion zu verhindern, benötigt der Körper in diesem Fall schnell reagierende Reparaturmechanismen, um die beschädigte Epithelschicht zu ersetzen. Dieser Vorgang wird als intestinale Wundheilung bezeichnet. Ausgelöst und koordiniert wird sie durch Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die hauptsächlich von zirkulierenden Immunzellen sezerniert werden. Zytokine sorgen außerdem dafür, dass der Regenerationsprozess nach vollständigem Verschluss der Wunde auch wieder beendet wird, um so ein überschießendes Wachstum von Zellen zu vermeiden [7-11]. Versagt die epitheliale Wundheilung, kann das zu einer dauerhaften Entzündung in der Darmschleimhaut führen. Wird die Proliferation zu stark angeregt, können als Folge kolorektale Karzinome entstehen. Eine exakte Feinregulation der Proliferation im intestinalen Epithel ist somit die Voraussetzung für eine gesunde Darmhomöostase.

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) kommt es zu einer schubweise auftretenden Entzündung im Gastrointestinaltrakt [12]. Der Begriff umfasst die beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz von CED sind in den letzten Jahren angestiegen und besonders häufig wird die Krankheit im jungen Erwachsenenalter symptomatisch [13, 14]. Unterschiede der

beiden Krankheitsbilder zeigen sich im Befallsmuster und in der Lokalisation der Entzündung im Magen-Darm-Trakt [15]. Während beim M. Crohn alle Abschnitte des Gastrointestinaltraktes von der Mundhöhle bis hin zum After befallen sein können und häufig auch extraintestinale Manifestationen auftreten, ist die Entzündung bei der Colitis ulcerosa gewöhnlich auf den Dickdarm beschränkt [16, 17]. Zudem ist die Colitis ulcerosa ausschließlich in der Schleimhaut lokalisiert, wohingegen der M. Crohn alle Wandschichten betreffen kann und dadurch häufig tiefe Gewebedefekte verursacht [18]. Komplikationen wie Darmverschlüsse, Fisteln und Perforationen sowie ein erhöhtes Risiko für Darmkrebs als Langzeitfolge machen zusätzlich zu einer regelmäßigen medizinischen Überwachung immer wieder Operationen notwendig [19].

1.1.1 Veränderungen der Immunantwort

Bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten verläuft die Immunantwort in der Darmschleimhaut im Vergleich zum gesunden Organismus überschießend und verlängert. Durch die Schädigung der Darmbarriere erfolgt eine Invasion von Mikroorganismen und ein Transfer von Antigenen in tiefere Schleimhautschichten [1, 20]. Aus bislang unbekannten Gründen werden selbst kommensale Bakterien nicht mehr automatisch als „Freund“ wahrgenommen, sondern können ebenso wie pathogene Erreger eine Immunantwort auslösen [21]. Die angeborene Immunabwehr identifiziert das schädigende Potenzial eines pathogenen Erregers über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors, PRRs*) [22]. Sobald ein pathogenes Muster erkannt wurde, wird der Erreger insbesondere von Antigen präsentierenden Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen aufgenommen, dort prozessiert und anschließend an der Zelloberfläche anderen Zellen des Immunsystems präsentiert, wodurch eine Entzündungskaskade gestartet wird [1]. Im Einzelfall können jedoch auch Epithelzellen selbst Antigene präsentieren [23]. Häufig ist das Expressionsmuster von PRR in Enterozyten bei Patienten mit CED deutlich verändert, sodass eine Entzündungsreaktion bei pathogenen und nicht-pathogenen Strukturen niederschwellig initiiert wird [15]. Eine mögliche Folge ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), der wiederum die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) bewirkt [24, 25]. Die Zytokine locken Zellen der Immunabwehr wie Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen an und

fördern deren Differenzierung in Richtung von pro-entzündlichen Effektorzellen, während die Bildung von regulatorischen T-Zellen unterdrückt wird. Das Gleichgewicht zwischen entzündungsfördernden T_{H1} - und T_{H17} -Zellen auf der einen Seite und regulatorischen T_{reg} -Zellen auf der anderen Seite wird damit zugunsten der Entzündung verschoben [26]. Zusätzlich ist bei Patienten mit CED die Apoptose und damit Gegenregulation von T-Zellen unterdrückt, sodass eine einmal induzierte Immunantwort nicht wieder beendet wird [27].

1.1.2 Genetische und nicht-genetische Ursachen

Die Entstehung von CED ist multifaktoriell und kann nicht auf eine einzelne Genmutation zurückgeführt werden [28]. Vielmehr handelt es sich um ein Zusammenspiel aus einer genetischen Prädisposition, Umweltfaktoren und dem individuellen Lebensstil.

Die unterschiedliche Prävalenz der CED in verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen legt eine genetische Veranlagung nahe [29]. Zwillingsstudien haben zudem bestätigt, dass monozygote Zwillinge von Patienten mit CED ein erhöhtes Risiko haben, ebenfalls an M. Crohn (etwa 40% Konkordanz) bzw. an Colitis ulcerosa (etwa 10% Konkordanz) zu erkranken [15, 30]. In Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden über 100 Genloci für Risikogene identifiziert [31-33]. Dabei handelt es sich um *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), die zur verstärkten oder verminderten Funktion eines Genabschnittes führen und dadurch mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert sein können [34]. Über welchen Pathomechanismus diese SNPs die Entstehung von CED beeinflussen, wurde bislang nicht für jedes Gen im Detail beschrieben. Während einige der Riskogene für beide Krankheiten überlappend sind, wurde für andere ein selektiver Einfluss für M. Crohn oder Colitis ulcerosa identifiziert. Die bis heute stärkste Assoziation mit dem Auftreten einer M. Crohn-Erkrankung zeigt das Gen für den *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (NOD2)-Rezeptor auf Chromosom 16, der als PRR pathogene Muster von Bakterien erkennen kann und das angeborene Immunsystem aktiviert [35, 36].

Als Umwelteinflüsse, die mit der Erkrankung an CED in Verbindung stehen, wurden Luftverschmutzung sowie eine übermäßige Körperhygiene in den ersten Lebensmonaten identifiziert. Die daraus abgeleitete Hygiene-Hypothese besagt, dass ein verminderter Kontakt zu Mikroorganismen gerade zu Beginn des Lebens die Entwicklung von wichtigen Mechanismen der Immunregulation und -toleranz verhindert [37, 38].

Klinisch-epidemiologische Studien, die sich mit dem Lebensstil von CED-Patienten beschäftigen haben, konnten als weitere Einflussfaktoren Rauchen und Ernährungsgewohnheiten feststellen. Während Rauchen die Entzündung bei Patienten mit M. Crohn verstärken und das Risiko für extraintestinale Manifestationen der Krankheit erhöhen soll, wurde für die Colitis ulcerosa ein protektiver Effekt beschrieben [39, 40]. Neue Studien weisen darauf hin, dass das Schädigungspotenzial von Rauchen von individuellen genetischen Faktoren abhängt. Yadav et al beschrieben, dass genetisch determinierte Suszeptilität im DSS-Kolitis-Modell, wie sie beispielsweise bei IL-10-*Knockout*-Mäusen vorliegt, durch Tabakexposition signifikant potenziert werden kann [41]. Diese Beobachtung zeigt nicht nur eine protektive Wirkung von IL-10, sondern legt insbesondere eine Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen nahe. Auch Liu et al. zeigten eine Wechselwirkung zwischen CED-Risikogenen wie ATG16L1 und Tabakrauch [42].

Die Ernährung besitzt einen direkten Einfluss auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms und kann Fehlregulierungen des Immunsystems hervorrufen. Studien haben gezeigt, dass der hohe Konsum von Kohlenhydraten und fettreichen Speisen in den Industriestaaten zu einer erhöhten Inzidenz von CED führt [43]. Eine ausgewogene Ernährung mit vielen Ballaststoffen und Früchten hingegen geht mit einem geringeren Risiko für entzündliche Darmerkrankungen einher [44]. Desweiteren erhöhen chronischer Stress, intestinale Infektionen und frühe Antibiotikaeinnahme bei Säuglingen die Auftretenswahrscheinlichkeit von CED, wohingegen das Stillen Neugeborener (M. Crohn und Colitis ulcerosa) und eine Appendektomie (nur bei Colitis ulcerosa) vor der Erkrankung an einer CED schützen können [45-47]. Als gemeinsames Merkmal haben diese Risikofaktoren einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms, eine direkte schädigende Wirkung auf das Darmepithel oder führen zu einer Modulation des Immunsystems [48, 49]. Dass sowohl die in den GWAS identifizierten Risikogene als auch die krankheitsbegünstigenden Umweltfaktoren für M. Crohn und Colitis ulcerosa nicht identisch sind, deutet auf Unterschiede in ihrer Pathogenese hin.

1.1.3 Endoplasmatischer Retikulumsstress

Einige der Riskogene, die in den GWAS-Analysen eine Assoziation mit CED zeigten, sind Teil der sogenannten *Unfolded Protein Response* (UPR). Dabei handelt es sich um einen Prozess, den die Zelle initiiert, sobald die Anzahl an un- oder missgefalteten

Proteinen, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) posttranslational modifiziert werden müssen, die Kapazität des ER übersteigt [50]. Man spricht von Endoplasmatischem Retikulumsstress. Auch eine hypoxische Stoffwechsellaage, Nährstoffkarenz und intrazelluläre Kalziumspiegel-Veränderungen stellen neben der Akkumulation von ungefalteten Proteinen mögliche Stressreize für das ER dar [51, 52]. Die UPR besteht aus drei Zweigen intrazellulärer Signalwege, die durch die drei Transmembranproteine *protein kinase like ER kinase* (PERK), *inositol requiring enzyme 1* (IRE1) und *activation transcription factor 6* (ATF6) verkörpert werden [52]. Unter physiologischen Bedingungen stehen sie unter der Kontrolle des *binding immunoglobulin protein* (BiP), welches als Sensor die erhöhte Anzahl von ungefalteten Proteinen registriert und daraufhin seinen hemmenden Einfluss auf PERK, IRE1 und ATF6 verliert [53, 54]. Das Ziel besteht darin, die Überladung des ER zu beheben und so die Zellhomöostase wiederherzustellen. Um die hohe Anzahl an ungefalteten Proteinen zu reduzieren, leitet die UPR einen Translationsstopp ein und induziert eine Transkription von Genen, die für Faltung und Qualitätskontrolle von Proteinen benötigt werden [55]. Eine Disinhibition von IRE1 führt beispielsweise zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *x-box binding protein 1* (XBP1) [55]. XBP1 wiederum reguliert die Transkription von Chaperonen, die zur korrekten Faltung von Proteinen beitragen und dadurch ER-Stress reduzieren [56]. Gleichzeitig werden Degradierungsprozesse initiiert, deren Ziel darin besteht, defekte Proteine abzubauen [50]. Gelingt es nicht, mit diesen Kompensationsmechanismen das Gleichgewicht in der Zelle wiederherzustellen, wird das Apoptoseprogramm gestartet [50].

Auf der einen Seite sind ER-Stress und die UPR wichtige zellbiologische Mechanismen, die eine intrazelluläre Homöostase wiederherstellen sollen. Genetische Modifikationen, die eine regulierte UPR verhindern, führen zu einer verstärkten Aktivierung von Entzündungsmediatoren. So wurde beispielsweise von Kaser et al. gezeigt, dass ein konditionaler Knockout von XBP1 im intestinalen Epithel bei Mäusen eine gesteigerte Aktivierung von TNF- α auslöst [57]. Solche genetisch veränderten Mäuse entwickeln eine spontane Enteritis [58, 59]. Auch Adolph et al. beschrieben eine NF κ B- getriggerte Entzündungsreaktion und Überexpression von TNF- α durch XBP-1-Verlust im intestinalen Epithel [50].

Auf der anderen Seite kann auch die UPR selbst eine Entzündungsreaktion auslösen. Dieses geschieht durch eine Überaktivierung der Transkriptionsfaktoren infolge von persistierendem ER-Stress, der die Kompensationsmechanismen des ER übersteigt

[60]. Auch an dieser Stelle spielen insbesondere die Aktivierung der proinflammatorischen Faktoren JNK, NFκB, TNF-α und reaktive Sauerstoffspezies eine bedeutende Rolle [57, 60]. Ebenso wurde eine Assoziation zwischen starker Expression von ER-Markergenen und dem Wachstum von Tumoren beschrieben [61]. Eine exakte Regulierung der UPR ist somit entscheidend. Weitere Risikogene neben XBP1, die mit ER-Stress assoziiert sind, sind zum Beispiel ATG16L1 und Ormdl3 [42, 62].

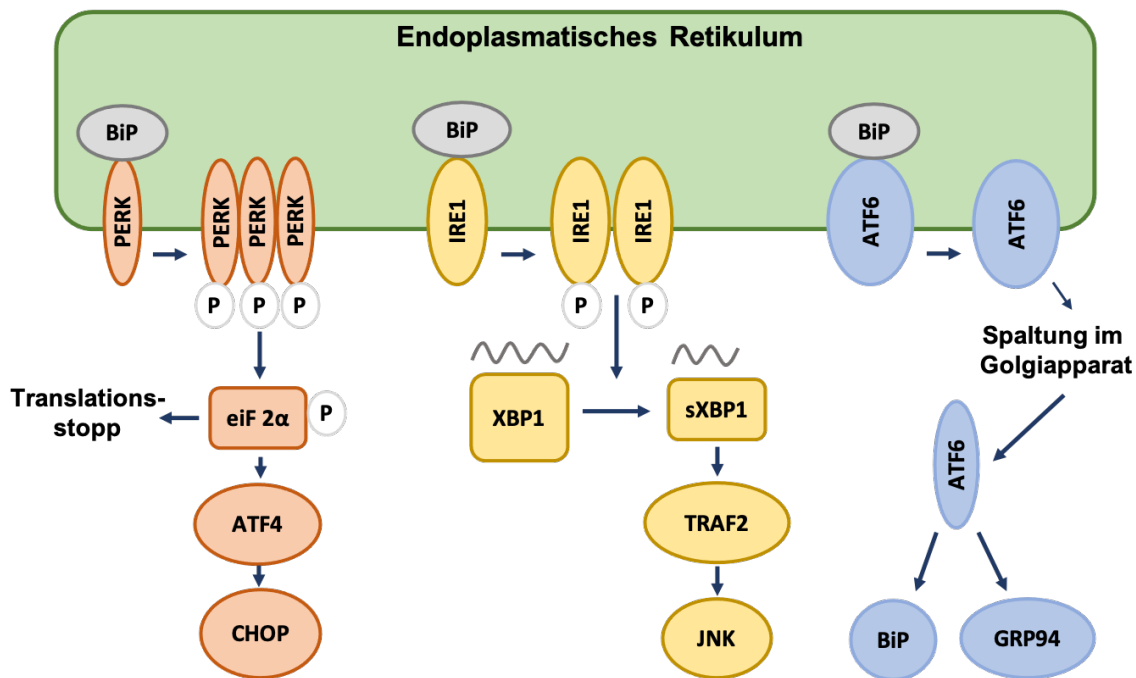


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Unfolded Protein Response

ER-Stress führt zur Aktivierung aller drei Zweige der UPR. BiP detektiert ungefaltete Proteine und dissoziiert von den Effektorproteinen PERK, IRE1 und ATF6, die durch diese Disinhibierung aktiviert werden. PERK und IRE1 untergehen Autophosphorylierung, während ATF6 im Golgiapparat geschnitten wird und erst hierdurch aktivierenden Einfluss auf die nachgeschalteten Faktoren BiP und GRP94 besitzt. PERK vermittelt einen Translationsstopp über die Phosphorylierung des Faktors eIF2α und induziert desweiteren die Faktoren ATF4 und CHOP. IRE1 besitzt Endoribonukleaseaktivität und erzeugt ein spezielles *Spliceprodukt* von XBP1, das über mehrere Schritte JNK aktiviert. Über die Effektormoleküle reguliert die UPR die Produktion neuer Proteine und bewirkt die Faltung und den Abbau von defekten Proteinen. Bei starker Überlastung induziert sie die Apoptose (Modifiziert nach Kaser et al, 2011 [53])

1.1.4 Herabgesetzte intestinale epitheliale Wundheilung

Eine Grundvoraussetzung für die Wiederherstellung der Darmhomöostase ist die intestinale epitheliale Wundheilung, die der Transmigration von Pathogenen und einer

überschießenden Immunreaktion entgegenwirkt. Im gesunden Organismus verläuft die epitheliale Wundheilung in drei Phasen ab [63]. Zuerst migrieren anliegende Epithelzellen zum Zellschichtdefekt und bedecken die Wunde oberflächlich. Sie bilden Pseudopodien, kleine Ausläufer der Zellmembran, aus und vernetzen sich damit untereinander, um so zügig eine vorläufige neue Barriere zu bilden (epitheliale Restitution) [3]. Dieser Prozess bedarf keiner Zellteilung, es handelt sich lediglich um ein Zusammenspiel aus Migration und Strukturveränderung von bereits vorhandenen Zellen [64]. In der zweiten Phase proliferieren Vorläuferzellen und differenzieren in der letzten Phase zu neuen Epithelzellen aus (epitheliale Regeneration) [65]. Zusammengefasst besteht der Reparaturvorgang des Epithels also aus den drei Schritten Restitution, Proliferation und Differenzierung. Verstärkt wird die epitheliale Proliferation und die anschließende Differenzierung durch zelluläre Botenstoffe wie *endothelial growth factor* (EGF) und *transforming growth factor beta* (TGF- β) [66, 67].

Ein wichtiges Charakteristikum von CED ist neben der initialen Beschädigung der Zellbarriere eine herabgesetzte Wundheilung im intestinalen Epithel [68]. Klinisch prägt sich die fehlende Wundheilung durch das Auftreten von Schleimhautulzera aus, die im schlimmsten Fall zu Perforationen der gesamten Darmwand führen können [63]. Je weniger die physiologische Wundheilung funktioniert, desto ausgedehnter und tiefer präsentieren sich die Schleimhautschäden in endoskopischen Untersuchungen und desto aggressiver schreitet die Krankheit voran [63, 69]. Eine schwache epitheliale Wundheilung ist ein Indikator für den Schweregrad der Erkrankung. Das Ausmaß der Wundheilung hingegen korreliert negativ mit der Aggressivität, zeigt als endoskopischer Marker eine Remission an und kann damit sowohl als Maßstab für den Therapieerfolg als auch als Prognosemarker herangezogen werden [63]. Bei der Colitis ulcerosa kann eine fehlende mukosale Wundheilung als endoskopischer Verlaufsparemeter zur Indikationsstellung einer Kolektomie (ultima ratio) beitragen [63, 70].

In Studien konnte gezeigt werden, dass auch ein prolongierter ER-Stress die Wundheilung im intestinalen Epithel beeinträchtigt und auf diese Weise an der Entstehung von CED beteiligt ist [71]. Ein Versagen der UPR mündet in der Aktivierung der Apoptose und führt zu Gewebedefekten. Die Barriestörung führt wiederum zu einer verstärkten Immunantwort [50].

1.1.5 Therapiestrategien

Eine kausale Therapie von CED ist bislang nicht möglich. Konventionelle Behandlungskonzepte mit Kortikosteroiden, Aminosalizylaten und Methotrexat, die die Immunantwort modulieren, zeigen zwar bei einem Teil der Patienten einen positiven Einfluss, können jedoch bei vielen Erkrankten keinen ausreichenden Therapieerfolg erzielen. Gleichzeitig kann die Behandlung schwerwiegende Nebenwirkungen und Organschädigungen hervorrufen [72-75]. Für solche Patienten, bei denen die konventionelle Therapie versagt, stellen Biologika eine weitere Therapieoption dar. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper, die spezifisch gegen einzelne Entzündungsmediatoren gerichtet sind und so gezielt die schädigende Entzündungsreaktion abschwächen. Bei CED sollen die Zytokine, die die Darmbarriere angreifen und dadurch die Entzündung aufrechterhalten, gehemmt werden [76]. Ein Hauptangriffsziel ist dabei das Zytokin TNF- α , dessen Blockade durch monoklonale Antikörper wie Infliximab, Adalimumab oder Certolizumab bei vielen Patienten mit CED zu einem signifikanten Rückgang der Krankheitsaktivität führt [77, 78]. Einige Patienten bleiben unter der TNF- α -Inhibition jedoch therapierefraktär. Zudem kommt es bei einer weiteren Gruppe von Patienten nach initialer klinischer Remission durch TNF- α -Blockade zu einem sekundären Krankheitsprogress [79]. Für das Biologikum Infliximab wurde zum Beispiel ein sekundärer Wirkungsverlust durch die Bildung von Antikörpern gegen den Wirkstoff identifiziert [80, 81].

Aus diesem Grund wird nach alternativen Angriffspunkten geforscht. Eines der Zytokine, das an der Pathogenese von M. Crohn und Colitis ulcerosa beteiligt und bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Serum erhöht nachweisbar ist, ist Interleukin-6 [82]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf mit klinischen und endoskopischen Korrelaten auch ein starker Anstieg von IL-6 zu beobachten war [83]. Ein erhöhtes Serum-IL-6 wiederum sagt auch ein erhöhtes Risiko für eine zukünftige Verschlechterung des Krankheitszustandes voraus. Hohe Krankheitsaktivität ist somit auch mit einem Serumanstieg von IL-6 assoziiert, sodass sich durch das IL-6-Monitoring ein Rückschluss auf den Schweregrad von CED ziehen lässt [84].

1.2 Interleukin-6

Das Zytokin Interleukin-6 bildet zusammen mit sechs weiteren Zellbotenstoffen (Interleukin 11 (IL-11), Interleukin-27 (IL-27), Oncostatin-M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1),

leukemia inhibitory factor (LIF) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF)) die IL-6-Familie, die Ähnlichkeit in ihrer Struktur und biologischen Funktionen aufweisen [85]. Allen gemein ist der Korezeptor gp130, der durch die Bindung der Zytokine an ihre spezifischen Rezeptoren aktiviert wird [86]. Unter physiologischen Bedingungen betragen die Serumlevel von IL-6 1-10 pg/ml. Diese Konzentration kann sich im Entzündungszustand um den Faktor 1000 auf 1-10 ng/ml erhöhen [87, 88]. Sezerniert wird IL-6 von Zellen des Immunsystems wie T-Zellen und Monozyten sowie von Endothelzellen und Fibroblasten [89]. Als ein entzündungsfördernder Botenstoff initiiert IL-6 in der Leber die Akute-Phase-Antwort, lockt als Chemokin Immunzellen an und steuert deren Differenzierung [86, 90]. Reguliert und beendet wird das IL-6-Signal durch Mitglieder der SOCS-Familie sowie durch die Phosphatase SHP2 [91].

1.2.1 **Classic und Trans-Signaling des Zytokins Interleukin-6**

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie das IL-6-Signal auf eine Zelle übertragen werden kann. Beim sogenannten klassischen Signalweg (*Classic Signaling*) bindet ein freies IL-6-Molekül an den membranständigen IL-6-Rezeptor (mIL-6R) einer Zelle, woraufhin je zwei Einheiten des Korezeptors gp130 mit dem Komplex aus IL-6 und dem mIL-6R (IL-6/mIL-6R) assoziieren [86]. An gp130 angeheftete Kinasen der Jak-Familie werden dadurch aktiviert und aktivieren ihrerseits durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren wie die STAT-Proteine, die die Expression von bestimmten Genen in der Zelle regulieren [92]. Der mIL-6R wird auf der Oberfläche von nur wenigen Zelllinien exprimiert. Dazu gehören Hepatozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, wohingegen der Korezeptor gp130 in beinahe allen Zellen zu finden ist [88, 93]. Auch auf die Zellen, die den mIL-6R nicht besitzen, kann ein IL-6-Signal übergeleitet werden. Dieses geschieht über einen alternativen Signalweg, dem sogenannten *Trans-Signaling* [94]. Hierbei wird eine lösliche Form des IL-6R erzeugt (*sIL-6R*), die extrazellulär mit freiem IL-6 einen Komplex (IL-6/sIL-6R) bildet und wie beim *Classic Signaling* gp130 aktiviert [95].

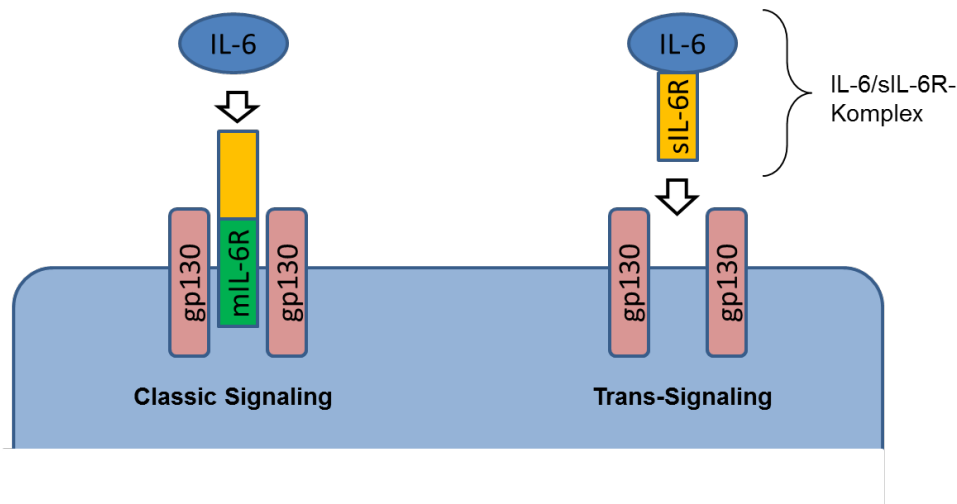


Abbildung 1.2: Classic und Trans-Signaling von IL-6

IL-6 bindet entweder an den membranständigen IL-6R und aktiviert zusammen mit gp130 intrazelluläre Signalwege wie die Jak/STAT-Kaskade (*Classic Signaling*) oder es bindet bereits extrazellulär an den löslichen sIL-6R und aktiviert gp130 in Abwesenheit des membrangebundenen IL-6R (*Trans-Signaling*). (Modifiziert nach Rose-John, 2012 [87])

Der sIL-6R entsteht zum größten Teil durch die Abspaltung der extrazellulären Domäne eines membrangebundenen IL-6R mittels proteolytischer Enzyme, allen voran ADAM10 und ADAM17 [96, 97]. Dieser Prozess wird *Shedding* genannt. Alternativ kann im Menschen, nicht jedoch in der Maus, der sIL-6R auch über alternatives *Splicing* der RNA für den mIL-6R gebildet werden [95, 98]. Die physiologische Serumkonzentration des sIL-6R beträgt 25-150 ng/ml und ist damit um den Faktor 10.000 höher als die von freiem IL-6. Im Entzündungszustand erhöht sich die Konzentration des sIL-6R auf das 6-8 fache, während IL-6 um den Faktor 1.000 ansteigt, sich die Konzentrationen also stärker angleichen [87, 88]. Um die Rolle von *Trans-Signaling* in-vitro und in-vivo unabhängig von *Classic Signaling* zu testen, wird häufig das Designer-Protein Hyper-IL-6 (hIL-6) verwendet, das aus der Fusion eines Moleküls IL-6 und dem kovalent gebundenen sIL-6R besteht und somit unabhängig vom membranständigen IL-6R den gp130-Rezeptor aktiviert [99].

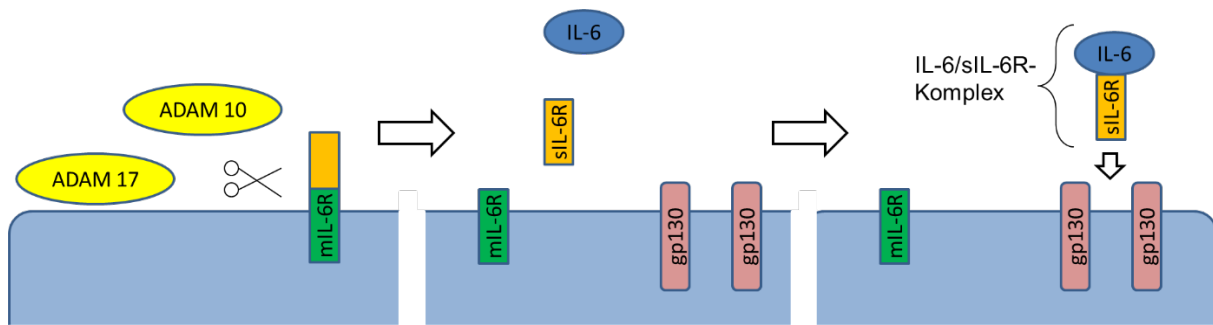


Abbildung 1.3: Shedding des membranständigen IL-6 Rezeptors erzeugt den löslichen IL-6R

Metalloproteinasen aus der ADAM-Familie spalten die extrazelluläre Domäne des mIL-6R ab und bilden dadurch den sIL-6R. Freies IL-6 kann an diesen löslichen Rezeptor binden und die Zelle über *Trans-Signaling* aktivieren. *Classic Signaling* kann über diesen Rezeptor nicht mehr stattfinden. (Modifiziert nach Rose-John, 2012 [87])

In der Literatur werden den beiden Signalwegen unterschiedliche Funktionen und Rollen in der Pathogenese von Erkrankungen zugeschrieben. Es wurde gezeigt, dass besonders *Trans-Signaling* für die entzündungsfördernde Effekte von IL-6 verantwortlich ist [86]. Dazu gehört die Rekrutierung von Immunzellen wie T-Lymphozyten und Monozyten und deren Differenzierung zu inflammatorischen T_{H1} - und T_{H17} -Zellen bzw. zu ausgereiften Makrophagen [26, 100]. Die Differenzierung in Richtung der regulatorisch wirkenden und entzündungshemmenden T_{reg} -Zellen wird hingegen unterdrückt [101]. Damit bewirkt es einen Übergang von der ersten, ungerichteten Antwort des angeborenen Immunsystems, repräsentiert durch neutrophile Granulozyten, zur erworbenen und gezielten Immunabwehr der differenzierten T-Zellen und Makrophagen bzw. von der akuten zur chronischen Entzündung [102]. IL-6-*Trans-Signaling* ist zudem an der Entstehung und am Wachstum von Tumoren beteiligt, indem es in den Zellzyklus eingreift und dort die Zellteilung induziert. Darüber hinaus verhindert es den programmierten Zelltod über Heraufregulation der antiapoptotischen Proteine bcl-2 und bcl-xL [89, 103]. Demgegenüber vermittelt *Classic Signaling* mildere Effekte und hat metabolische Eigenschaften im Blutzuckerstoffwechsel sowie einen positiven Einfluss auf die epitheliale Wundheilung [86]. In vielen Geweben wurde die Rolle von IL-6 eingehend untersucht. Dabei wurde ein wundheilungsfördernder Effekt von IL-6 beispielsweise in Kornealzellen (*Classic* und *Trans-Signaling*), Keratinozyten (*Trans-Signaling*) und in der Regeneration der Leber (*Trans-Signaling*) und dem Pankreas (*Classic Signaling*) beobachtet [104-107]. Die Existenz des mIL-6R wurde auch für intestinale Epithelzellen

beschrieben, seine Rolle und die des *Classic Signalings* im intestinalen Epithel ist jedoch nicht vollständig untersucht [108].

1.2.2 Die Rolle der Jak/STAT-Kinasen

Die Bindung von IL-6 an seine Rezeptoren führt über *Classic* und *Trans-Signaling* zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege. Der prominenteste unter ihnen ist der Jak/STAT-Signalweg, dem eine wichtige Rolle für die angeborene und erworbene Immunabwehr zugeschrieben wird [109, 110]. An gp130 angeheftete Januskinasen (Jak) werden nach Bindung von IL-6 an seine Rezeptoren aktiviert und aktivieren ihrerseits über Phosphorylierung Mitglieder der *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Familie [24]. Für gp130 wurde eine Aktivierung über Jak1 und Jak2 beschrieben [111]. Je zwei phosphorylierte STAT-Moleküle bilden zusammen ein Dimer und gelangen in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor die Transkription verschiedener Gene regulieren.

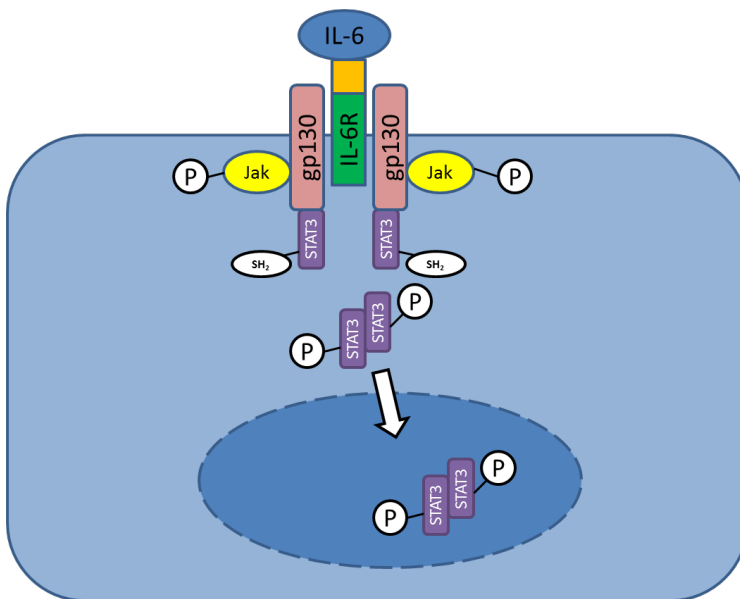


Abbildung 1.4: Aktivierung der STAT3-Kinase durch IL-6-Signale

Durch IL-6 *Classic* oder *Trans-Signaling* wird der Korezeptor gp130 aktiviert. Dort angeheftete Jak-Kinasen werden phosphoryliert und aktivieren wiederum STAT-Kinasen durch Phosphorylierung. Ein Homodimer aus zwei pSTAT3-Molekülen reguliert nach Translokation in den Zellkern die Genexpression. (Modifiziert nach Yu et al., 2014 [112])

In vielen Studien wurde gezeigt, dass STAT3 einen wichtigen Faktor für die Regeneration und Wundheilung in zahlreichen Geweben wie dem ZNS, der Haut und der Leber darstellt [113-115]. Mithilfe des DSS-Modells wurde die Rolle von STAT3 für die

Entstehung von chronischen Entzündungen im Darm und für die intestinale Wundheilung in Mäusen untersucht. Hierbei erhalten die Tiere über mehrere Wochen Natrium-Dextransulfat (DSS) über das Trinkwasser, welches die natürliche Integrität des Darmepithels zerstört, woraufhin die Tiere eine starke Entzündung von Dün- und Dickdarm entwickeln [116]. Es wurde gezeigt, dass Mäuse, die durch einen genetischen *Knockout* im intestinalen Epithel kein STAT3 besitzen, eine schwerwiegendere Darmentzündung entwickeln als ebenso behandelte Mäuse ohne genetische Veränderung [24]. In Tumorgenese-Versuchen, bei denen Darmtumore durch mehrere Zyklen von DSS und dem Karzinogen Azoxymethan (AOM) erzeugt werden, entwickeln diese Mäuse hingegen weniger Tumore als ihre Artgenossen, die STAT3 normal exprimieren [24]. Andere Mäuse, bei denen die Jak/STAT3-Achse übermäßig stark aktiviert ist, sind wiederum besonders anfällig für die Bildung von Darmtumoren [59]. Diese Versuche zeigen, dass aktiviertes STAT3 die Proliferation von intestinalen Epithelzellen induziert, wodurch die Entstehung und das Wachstum von Tumoren begünstigt werden, aber auch die Wundheilung im entzündeten Darm angeregt wird [24].

Seit 2018 ist der Jak/STAT-Inhibitor Tofacitinib für die Behandlung der Colitis ulcerosa zugelassen. Tofacitinib wirkt inhibitorisch auf alle Jak-Kinasen, hemmt aber insbesondere Jak1 und Jak3, worunter es u.a. zu einer verminderten Aktivierung von STAT3 kommt [111]. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit moderater bis starker Krankheitsaktivität von einer Jak/STAT-Inhibition profitierten, da sowohl die Induktion als auch Erhaltung einer Krankheitsremission erzielt wurden [117, 118].

STAT3 wird zusätzlich durch die Zytokine IL-11, IL-22 und IL-10 aktiviert [119, 120]. Hervorzuheben ist dabei die Rolle von IL-10, da es im Gegensatz zu den anderen entzündungsregulierend und nicht –fördernd wirkt [121]. Sein spezifischer Einfluss auf intestinale Epithelzellen ist jedoch nicht ausreichend beschrieben. Die IL-6/Jak/STAT-Achse ist diejenige Signalkaskade, für die die proliferative Wirkung von IL-6 am ausführlichsten beschrieben wurde. IL-6 induziert außerdem die MAPK-Kaskade sowie die PI3K-Kaskade, die ebenfalls proliferatives Potential besitzen [24, 122, 123].

1.2.3 Hemmung der IL-6-Signalwege

Angeichts der zunehmenden Inzidenz von CED besonders bei jungen Patienten, dem Schweregrad der Erkrankung mit teilweise gravierenden Folgeschäden, den unzureichenden Therapiemöglichkeiten, die gleichzeitig viele Nebenwirkungen hervorrufen, ist eine Forschung an alternativen Therapiestrategien zwingend notwendig.

Seitdem die Bedeutung von IL-6 in der Pathogenese von vielen Autoimmunkrankheiten bekannt ist, wurden Tierversuche und klinische Studien durchgeführt, in denen die entzündungsfördernde Wirkung von IL-6 therapeutisch ausgeschaltet wurde. Es gibt drei verschiedene Ansätze hierfür:

Die erste Möglichkeit besteht darin, mit einem IL-6-Antikörper die gesamte IL-6-Antwort, also *Classic* und *Trans-Signaling*, auszuschalten. Ein Beispiel hierfür ist der monoklonale Antikörper Clazakizumab [124].

Der zweite Ansatzpunkt besteht in der Hemmung auf Rezeptorebene. Der IL-6R-Antikörper Tocilizumab inhibiert ebenfalls die IL-6-Antwort vollständig über eine Bindung der extrazellulären Domäne des IL-6R, die an der Aktivierung beider Signalwege beteiligt ist [125].

Die vollständige Hemmung von IL-6 über diese beiden Mechanismen zeigte eine Verbesserung der Symptome u.a. in den Tiermodellen des systemischen Lupus erythematoses und der rheumatoiden Arthritis [126, 127] und wurde daraufhin auch in klinischen Studien erfolgreich für die Rheumatoide Arthritis [128] und den Lupus erythematoses getestet [129, 130]. Danese et al. beschrieben zudem eine positive Wirkung des IL-6-Antikörpers PF-0423692 bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. In einer klinischen Studie ergab sich bei Patienten mit therapierefraktärem M.Crohn nach inadäquatem Ansprechen auf TNF α -Inhibition eine signifikant höhere Remissionsrate durch die Hemmung des IL-6-Signalweges, jedoch auch eine erhöhte Inzidenz von schwerwiegenden Komplikationen wie Perforation und Abszessbildung im Gastrointestinaltrakt [131].

Die dritte Möglichkeit stellt die selektive Blockade von *Trans-Signaling* dar. Natürlicherweise gibt es im Körper ein basales Level von löslichem gp130 (sgp130), das an den IL-6/sIL-6R-Komplex binden und dadurch seine Wirkung aufheben kann [132]. Hierbei handelt es sich um eine kompetitive Hemmung, denn gp130 und sgp130 konkurrieren um den IL-6/sIL-6R-Komplex. Fusioniert man sgp130 mit dem Fc-Teil eines IgG1-Antikörpers, erhält man das sogenannte sgp130Fc, das ein 10-100-fach höheres Potenzial besitzt *Trans-Signaling* zu inhibieren als natürlich vorkommendes sgp130 [88, 133]. Typischerweise interferiert es dabei nicht mit dem membranständigen IL-6R [134]. Weitere Studien weisen jedoch darauf hin, dass sgp130Fc in sehr hoher Konzentration auch *Classic Signaling* hemmt, da der Körper danach strebt, ein Gleichgewicht zwischen freiem IL-6 und dem im Komplex mit dem sIL-6R gefangenen IL-6 herzustellen. Je mehr IL-6/sIL-6R-Komplexe durch sgp130Fc neutralisiert werden, desto

mehr freies IL-6 assoziiert erneut mit dem sIL-6R und steht somit nicht mehr für den membrangebundenen IL-6R und für die Induktion von *Classic Signaling* zur Verfügung [88]. In verschiedenen Tierversuchen wurde die spezifische Rolle von *Trans-Signaling* bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten untersucht [135]. Dabei sah man einen starken entzündungsfördernden Effekt in der DSS-Kolitis, der Rheumatoiden Arthritis, dem AOM-Karzinogenese-Modell, Lupus erythematoses sowie in der Sepsis, während eine Hemmung mittels sgp130Fc zu einem Rückgang der Entzündung führte [103, 136-139]. 2013 musste eine klinische Studie (Bristol-Myers Squibb, IMI133-005) mit dem monoklonalen IL-6-Antikörper Clazakizumab bei Patienten mit therapieresistenter M. Crohn-Erkrankung vorzeitig abgebrochen werden, da es in zwei Fällen zu schwerwiegenden Nebenwirkungen mit intestinaler Perforation und dem Tod einer Patientin mit sehr geringem Body-Mass-Index gekommen war. Ebenso wurde über Darmperforationen als Nebenwirkung einer Tocilizumab-Therapie bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis berichtet [140], außerdem bei der Behandlung von M. Crohn mit dem IL-6-Antikörper PF-0423692 [131]. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass IL-6 zwar an der Pathogenese von CED beteiligt ist, aber gleichzeitig einen wichtigen Faktor für die intestinale Homöostase und Wundheilung darstellt. Ob diese regenerativen Prozesse durch *Classic* oder *Trans-Signaling* initiiert werden, bleibt bislang unklar.

1.3 Zielsetzung

In der folgenden Arbeit soll die spezifische Rolle von IL-6 *Classic* und *Trans-Signaling* in der intestinalen epithelialen Wundheilung untersucht werden.

I. Im ersten Abschnitt wird der Einfluss von IL-6 *Classic* und *Trans-Signaling* auf die intestinale Wundheilung in humanen Kolonkarzinomzellen betrachtet.

- a. Zunächst wird ein etabliertes Wundheilungsmodell (sog. *Scratch Assays*) an die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 angepasst, um auf diese Weise intestinale epitheliale Wundheilung in-vitro nachzubilden.
- b. Der Einfluss von *Classic* und *Trans-Signaling* auf die intestinale Wundheilung in humanen Kolonkarzinomzelllinien wird mittels gezielter Induktion und Hemmung beider Signalwege im Wundheilungsmodell charakterisiert.
- c. Mittels molekularbiologischer und proteinchemischer Methoden wird untersucht, ob *Classic* und *Trans-Signaling* den Jak/STAT3-Signalweg im gleichen Maße induzieren.
- d. Durch STAT3-Hemmung wird bestimmt, inwieweit das regenerative Potenzial von *Classic* und *Trans-Signaling* über den Jak/STAT3-Signalweg vermittelt wird.

II. Im zweiten Schritt wird der Einfluss von IL-6 *Classic* und *Trans-Signaling* in murinen intestinalen Epithelzellen betrachtet.

- a. Hierfür werden primäre intestinale Epithelzellen mit einem konditionalen *Knockout* des mIL-6R auf proteinchemische und molekularbiologische Unterschiede in der IL-6/Jak/STAT3-Signalachse untersucht.
- b. Desweiteren wird der Einfluss von *Classic* und *Trans-Signaling* auf die Bildung von Dünndarmorganoiden untersucht.

III. Im dritten Schritt wird die Rolle von IL-6 in der Entstehung von Endoplasmatischen Retikulumstress in humanen Kolonkarzinomzellen betrachtet.

- a. Zuerst wird auf molekularbiologischer Ebene bestimmt, inwieweit *Classic* und *Trans-Signaling* als Aktivatoren des Jak/STAT3-Signalweges Endoplasmatischen Retikulumstress induzieren.
- b. Anschließend wird untersucht, inwiefern eine Induktion von Endoplasmatischem Retikulumstress die epitheliale Wundheilung im Wundheilungsmodell beeinflusst.

IV. Zum Schluss wird diskutiert, inwiefern eine spezifische pharmakologische Modulation von IL-6 eine potenzielle Therapieoption für Patienten mit CED darstellt.

2 Methoden

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Methoden

	Zellverband	RNA-Ebene	Proteinebene
Methode	<i>Scratch Assay</i>	qRT-PCR	Western Blot
Messergebnis	Wundheilung	Genexpression	Proteinnachweis

2.1 Zellkulturmethoden

Alle Zellversuche wurden unter sterilen Bedingungen und mit sterilen Geräten und Materialien unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung (Thermo Scientific, Bremen) durchgeführt.

2.1.1 Kultivierung verwendeter Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (Tabelle 2.2) entstammen der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) und wurden konstant bei einer Temperatur von 37°C mit 5% (v/v) CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% in einer 650 ml Kulturflasche mit ihrem Nährmedium (Gibco/Life Technologies, Darmstadt) inkubiert.

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	DSMZ-Nummer	Herkunft	Eigenschaften	Nährmedium
HT-29	ACC-299	humanes kolorektales Adenokarzinom	adhärent, epithelial	DMEM, 10% (v/v) FCS
SW-480	ACC-313	humanes kolorektales Adenokarzinom	adhärent, epithelial	RPMI, 10% (v/v) FCS
HCT-116	ACC-581	humanes kolorektales Adenokarzinom	adhärent, epithelial	RPMI, 10% (v/v) FCS
LoVo	ACC-350	Metastase eines humanen kolorektalen Adenokarzinoms	adhärent, epithelial	RPMI 10% (v/v) FCS

Das Wachstum der Zellen wurde täglich mit einem Inversmikroskop (h500, Hund, Wetzlar) begutachtet und die Konfluenz der Zellen bestimmt. Zweimal pro Woche

wurde eine Passage durchgeführt. Die Zelllinien wurden nach einem Waschschrift mit PBS 5 Minuten lang mit 4 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (Life Technologies, Darmstadt) inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Flaschenboden zu lösen, und die Reaktion durch Addition von 8 ml des Nährmediums gestoppt. Die gelösten Zellen wurden in ein Spitzbodenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 4 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Für Stimulationsversuche wurde hiernach die Zelldichte bestimmt. Zur Aufrechterhaltung der fortlaufenden Zellkultivierung wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:10 in die Kulturflasche zurückgegeben. Um die genetische Ähnlichkeit der passierten Zellen zu der Ausgangszelllinie zu bewahren, wurden maximal 30 Passagen pro Zelllinie durchgeführt.

2.1.2 Bestimmung der Zelldichte und Aussaat der Zellen

Für die Bestimmung der Zelldichte wurden 20 µl der in 2.1.1 beschriebenen Zellsuspension in eine Zählkammer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen) pipettiert. Der Zellzähler misst die Konzentration der vitalen Zellen in acht verschiedenen Bereichen der Zählkammer und berechnet daraus die durchschnittliche Zellanzahl pro Milliliter der Probe. Die für Stimulationsversuche benötigte Anzahl von Zellen mit entsprechendem Volumen des Nährmediums ist in Tabelle 2.3 aufgelistet. Das jeweils benötigte Volumen der Zellsuspension V2 ergab sich aus der folgenden Formel:

$$\frac{V1 [ml] \times Z1 [ml^{-1}]}{Z2 [ml^{-1}]} = V2[ml]$$

V1: benötigtes Volumen des Nährmediums; V2: benötigtes Volumen der Zellsuspension

Z1: benötigte Zellkonzentration; Z2: gezählte Zellkonzentration in der Zellsuspension

Nach der Aussaat der Zellen in Kulturplatten (Sarstedt, Nümbrecht) wurde das Nährmedium alle 2-3 Tage gewechselt und die Konfluenz unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bestimmt. Stimulationsversuche wurden nach Erreichen von vollständiger Konfluenz begonnen.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Zellkulturformate

Format der Zellkultur	Anzahl der verwendeten Zellen	Volumen des Nährmediums
10 ml-Schale	5×10^6	10 ml
6-well-Platte	6×10^5	2 ml/ well
12-well-Platte	3×10^5	1 ml/ well
24-well-Platte	$1,5 \times 10^5$	500 μ l/ well
96-well-Platte	$2,5 \times 10^4$	100 μ l/ well

2.1.3 Zellernte

Um einen Stimulationsversuch zu beenden, wurde zunächst das Zellmedium entfernt. Für Versuche, bei denen Proteine im Überstand analysiert werden sollten, wurde das Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Rückstände des Mediums auf der Zelloberfläche wurden durch zweimaliges Spülen mit 4°C kaltem PBS entfernt, wodurch gleichzeitig der Metabolismus der Zellen durch Kühlung herabgesetzt wurde. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Um die Zellmembranen zu zerstören und die zu analysierenden zytoplasmatischen Bestandteile freizulegen, wurde eine lysierende Lösung hinzugegeben. Je nach Fragestellung wurden dazu unterschiedliche Agenzien verwendet, die in Tabelle 2.4 aufgeführt sind. Mit Hilfe eines Gummischabers wurden die adhärenen Zellen vom Plattenboden gelöst und in ein Reagenzgefäß gegeben.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Lysepuffer

Detektierter Zellbestandteil	Bestandteile des Lysecocktails	Verwendetes Volumen/ Reaktionsgefäß			
		6-well	12-well	24-well	Gewebe
Proteine	1 x DLB + 1% (v/v) 100 x Protease Inhibitor + 1% (v/v) 100 x Phosphatase Inhibitor Cocktail II	150 μ l	100 μ l	50 μ l	100-200 μ l
RNA	RLT-Puffer + 1% (v/v) β -Mercaptoethanol	600 μ l	350 μ l	350 μ l	600 μ l
Genomische DNA	ATL-Puffer (Qiagen, Hilden)	---	---	---	180 μ l

2.1.4 Mauslinie

Um die gewebsspezifische Funktion von einzelnen Proteinen zu studieren, kann die Cre-Lox-Technologie angewendet werden, mit der einzelne Gene aus der DNA entfernt werden können. Dabei wird der DNA-Abschnitt, der die Information für ein gesuchtes Protein enthält, von beiden Seiten von einer Erkennungssequenz, der sogenannten LoxP-Stelle, markiert [141]. Dieser Vorgang wird als *floxed* bezeichnet (aus dem engl. *flanked by loxP*). Die LoxP-Stelle wird von dem Enzym Cre-Rekombinase erkannt und die DNA-Sequenz zwischen den beiden LoxP-Stellen herausgeschnitten und so rekombiniert, dass sie die Kodierung für das Zielprotein nicht mehr enthält [141]. Die Cre-Rekombinase kann wiederum an ein gewebsspezifisches Protein gekoppelt werden, damit nur ganz bestimmte Zellen das Enzym produzieren. Zur Untersuchung einer gewebsspezifischen Proteinfunktion im Darmepithel wird Cre an das Reporterprotein Villin gebunden, sodass das gewählte Protein nur im intestinalen Epithel nicht mehr hergestellt wird [142]. Für die folgende Arbeit wurden sogenannte IL-6R^{ΔIEC} (Genoway, Lyon, Frankreich) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kreuzung aus IL-6R^{flox}-Mäusen und nativen C57Bl/6^{VillinCre}-Mäusen, die einen konditionalen *Knockout* für den mIL-6R im intestinalen Epithel aufweisen.

2.1.5 Isolierung muriner Dünndarm-Krypten

Für die Isolierung muriner Dünndarm-Krypten wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und der Dünndarm am Magenausgang und am Caecum abgesetzt und entnommen. Alle darauffolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Darm wurde mit 4°C kalter PBS-Lösung gespült, um den Mucus und Faeces zu entfernen, und longitudinal aufgeschnitten. Jeweils 1 cm lange Dünndarmabschnitte wurden in ein Spitzbodenröhrchen, gefüllt mit 15 mM EDTA-Lösung in PBS, gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation, während der das Röhrchen alle 2 Minuten sanft geschüttelt wurde, wurde der Überstand verworfen und das Röhrchen erneut mit EDTA aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, sodass Zelldetritus und oberflächliche Epithelzellen gelöst wurden. Anschließend wurde das Röhrchen mit PBS gefüllt und 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach 5 und nach 10 Minuten Inkubation wurde es erneut geschüttelt und die Flüssigkeit zweimal durch ein Zellsieb mit 100 µm Porenweite (BD, Heidelberg) gefiltert. In 1 µl des Durchflusses wurde die Konzentration der Darmkrypten unter dem Mikroskop bestimmt. Die Krypten-Suspension wurde 10 Minuten bei 4°C und 1.200 U/Min. zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert.

2.1.6 Kultivierung von Dünndarm-Organoiden

Die Einbettung muriner Dünndarm-Krypten erfolgte in Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membran Matrix (BD, Heidelberg)). Dieses ist eine aufgereinigte Matrix aus einer Sarkom-Zelllinie, deren Zusammensetzung der einer Basalmembran ähnelt (Hughes et al., 2010) [143]. Matrigel ist bei 4°C flüssig, während es bei 37°C als Hydrogel vorliegt. In einer 24-well-Platte wurden pro well 100 µl der Krypten-Suspension, resuspendiert in einer Konzentration von 5-10 Krypten pro Mikroliter in Matrigel, ausplattiert und das Gel für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank ausgehärtet. Im Anschluss wurde 1 ml Organoid-Medium/ well sowie murines EGF (100 ng/ml), R-Spondin-1 (500 ng/ml) und Noggin (100 ng/ml) hinzugefügt [144]. Das Medium wurde alle zwei Tage zusammen mit den Stimulantien erneuert und die Ausknospung und das Wachstum der Organoide regelmäßig unter dem Mikroskop dokumentiert.

Die Passage der Organoide erfolgte zwischen dem 6. und dem 8. Tag nach der Aussaat. Dazu wurde das Matrigel mit den darin eingebetteten Organoiden mit einem Spatel von der Zellkulturschale gelöst und in ein Reagenzröhrchen überführt. Dort wurden sie durch Auf- und Abpipettieren durch die verbogene Spitze einer 200 µl-Pipette mechanisch zerkleinert und im Verhältnis 1:4 in frischem Matrigel resuspendiert. Die Ausplattierung von 100 µl Organoid-Lösung/ well erfolgte wiederum in einer 24-well-Platte. Nach 10 Minuten Aushärtungszeit bei 37 °C wurden dem Medium die genannten Wachstumsfaktoren hinzugefügt. Der Stimulationsversuch erfolgte 2-5 Tage nach der 1. Passage. Dafür wurde das Medium erneuert, ohne erneut die Wachstumsfaktoren hinzuzugeben. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Organoide zusammen mit dem Matrigel, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, geerntet.

2.1.7 Isolierung muriner intestinaler Epithelzellen

Für die Isolierung intestinaler Epithelzellen wurde das Protokoll *Lamina Propria Dissociation Kit* von MACS verwendet. Zuerst wurde Dün- oder Dickdarm der Maus entnommen und mit 4°C kaltem PBS gespült. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Darm wurde longitudinal aufgeschnitten und in 1 cm langen Abschnitten in ein Spitzbodenröhrchen mit 20 ml einer vorbereiteten Vorverdauungslösung gegeben. Um die Epithelzellen von der darunterliegenden Lamina propria zu trennen, wurde die Lösung 20 Minuten lang bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (120 U/Min.) inkubiert und daraufhin für 10 Sekunden in einem Vortex-Gerät (Sartorius, Göttingen) geschüttelt. Größere Zellaggregate und Zelldetritus wurden mit Hilfe eines

100 µm starken Zellsiebes herausgefiltert und die zurückbleibenden Darmabschnitte erneut in der Vorverdauungslösung geschüttelt. Das Prozedere der Filtration wurde wiederholt und die Konzentration der intestinalen Epithelzellen im Durchfluss mit dem Zellzähler bestimmt. Für Stimulationsversuche wurde die Zellkonzentration gemäß Tabelle 2.5 angepasst und in Zellkulturplatten ausgesät. Die Ernte erfolgte analog zu Kapitel 2.1.3.

Tabelle 2.5: Verwendete Zellmenge für Stimulationsansätze

RNA	Proteine
1 Mio Zellen/ ml Medium	3 Mio Zellen/ ml Medium

2.1.8 Wundheilungs-Assay

Humane Kolonkarzinomzellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert, bis sie zu einem konfluenten Monolayer zusammengewachsen waren. Um den Stoffwechsel der Zellen zu vermindern, wurde der Anteil des fetalen Kälberserums (FCS) im Zellmedium 24 Stunden vor Versuchsbeginn von 10% (v/v) auf 1% (v/v) reduziert. Mithilfe einer 200 µl-Pipette wurden in jeder Kulturschale drei Wunden in der Zellschicht erzeugt, die anschließend zweimal mit PBS gespült wurden, um so die abgelösten Zellen zu entfernen. Nach Hinzugabe von frischem Zellmedium wurde die Ausdehnung der Wundfläche unter dem Mikroskop bestimmt. Die Zellen wurden nach dem vorgegebenen Protokoll stimuliert und die Wundfläche 4, 8 und 24 Stunden nach Stimulation erneut gemessen. Die Analyse des Bildmaterials erfolgte mit *AxioVision*, einer Computer-Software der Firma Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena).

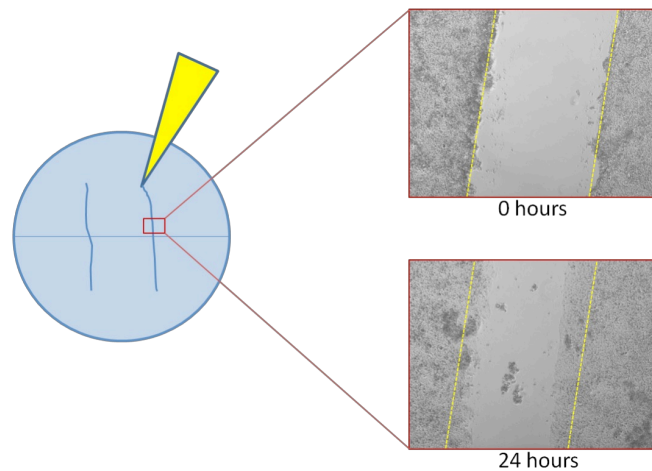


Abbildung 2.1: Prinzip eines Wundheilungs-Assays

Die mechanisch geschaffene Wundfläche wird direkt nach Verwundung und 24 Stunden später unter dem Mikroskop ausgemessen und das Wachstum berechnet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA aus nativem Gewebe wurde das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Alle Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zuerst wurden 25 mg des Gewebes mit 180 µl ATL-Puffer versetzt und 1 Minute bei 20 Hz in einem *TissueLyser* (Qiagen, Hilden) zerkleinert. Zusammen mit 20 µl Proteinase K wurde das Gemisch für etwa 1-3 Stunden bei 56°C und 400 U/Min. so lange in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert, bis sich das Gewebe vollständig aufgelöst hatte. Pro Reaktionsansatz wurden anschließend je 200 µl AL-Puffer und 100 % (v/v) Ethanol hinzugegeben, durch 10-sekündiges Schütteln mit einem Vortex-Gerät (Sartorius, Göttingen) gründlich vermischt und der Mix auf eine DNeasy Mini Spin Säule gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 Min., 800 U/Min.) wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit der daran gebundenen DNA auf ein neues Sammelgefäß gesetzt. Zwei Waschschrte in 500 µl AW1-Puffer bzw. 500 µl AW2-Puffer mit anschließender Zentrifugation (1 Minute, 800 U/Min. bzw. 3 Minuten, 13200 U/Min.) folgten. Daran anschließend wurde die Säule auf ein steriles Sammelgefäß gesetzt und mit 100 µl AE-Puffer 5 Minuten inkubiert.

Der Durchfluss, der durch 5-minütiges Zentrifugieren im Sammelgefäß entstand, enthielt die isolierte DNA. Die Konzentration der DNA wurde wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben bestimmt.

2.2.2 Isolierung von RNA

Das Prinzip der RNA-Isolation beruht darauf, dass Nukleinsäuren in Gegenwart von Salzen wie Guanidin-Isothiocyanat an eine Silicagel-Membran binden können, während übrige Zellbestandteile herausgewaschen werden. Durch einen DNA-Verdau wird die DNA degradiert und die gereinigte RNA kann in Wasser gelöst werden. Für die RNA-Isolation wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zellen wurden in der Vorbereitung mit 4°C kaltem PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer und 1% β-Mercaptoethanol lysiert und der Abbau der RNA durch das darin enthaltene Guanidin-Isothiocyanat verhindert. Anschließend wurde das Lysat auf die *QIAshredder*-Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 12.000 U/Min. zentrifugiert, um die langkettigen Nukleinsäuren zu zerkleinern. Durch Zugabe von 350 µl 70% Ethanol wurde die RNA an die Membran einer *RNeasy Mini Kit*-Säule gebunden, während übrige Zellkomponenten durch eine erneute Zentrifugation (30 Sekunden, 8.000 U/Min.) entfernt wurden. Nach einem Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer (30 Sekunden, 8.000 U/Min.) wurde die RNA von genomischer DNA gereinigt. Dafür wurde die Membran für 30 Minuten mit 80 µl der *DNase*-Lösung (70 µl RDD-Puffer + 10 µl *DNase*) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer und zweimaligem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation wurde die Säule für 5 Minuten mit 40 µl *RNase*-freiem Wasser inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren wurde die RNA von der Membran gelöst und das Zentrifugat in einem frischen RNA-Röhrchen aufgefangen. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem UV-Spektralphotometer (*NanoDrop*TM, *PeqLab Biotechnologie GmbH*, Erlangen) ermittelt. Dafür wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Qualitätskontrolle der Probe galt der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm, da eine hohe Absorption bei 280 nm auf eine Verunreinigung durch Proteine hinweist. Ausschließlich die Proben mit einem Quotienten zwischen 1,6 und 2,0 wurden für die weitere Analyse verwendet.

2.2.4 cDNA-Synthese

Um die Zielgene in der Real-time-PCR erfassen zu können, muss die isolierte mRNA in eine komplementäre DNA umgeschrieben werden. Dieses geschieht mit dem Enzym reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die aus einem Retrovirus isoliert wird. Damit die reverse Transkriptase den komplementären DNA-Strang synthetisieren kann, benötigt sie einen Primer, eine Startsequenz, die aus wenigen Oligonukleotiden besteht und komplementär zu dem Poly-A-Schwanz der mRNA ist. Für die cDNA-Synthese wurde das *Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Bremen) verwendet. Die Synthese umfasste zwei Arbeitsschritte. Zuerst fand bei 65°C das Anheften (*Annealing*) der Primers an den mRNA-Strang statt. Erst in einem zweiten Schritt wurde das Enzym hinzugegeben und die Synthese des komplementären DNA-Stranges gestartet. Die verwendeten Komponenten sowie den Ablauf der cDNA-Synthese enthält die Tabelle 2.6. Alle Reaktionsschritte wurden einem *Thermocycler* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) durchgeführt. Nach Ende der Reaktion wurde die cDNA in einem Verhältnis von 1 zu 10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese

Komponente	Volumen	Reaktionsschritte
Gesamt-RNA	1000 ng	5 Min. 65°C Abkühlen auf 4°C
DEPC H ₂ O	6,875 µl	
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	0,125 µl	
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	
5x RT-Puffer	2 µl	10 Min. 25°C
Maxima H Minus RT	0,5 µl	15 Min. 50°C 5 Min. 85°C Abkühlen auf 4°C

2.2.5 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Vervielfältigung und anschließenden Quantifizierung der cDNA wurde eine Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchgeführt. Bei dieser wird wie bei einer gewöhnlichen PCR die DNA in mehreren Amplifikationsszyklen vervielfältigt, aber zusätzlich nach jedem Zyklus die

Menge des DNA-Produktes bestimmt. Diese Quantifizierung geschieht mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes wie dem Cyanin-Farbstoff SYBR® Green, der in die neu synthetisierte Doppelstrang-DNA eingebaut wird und damit stellvertretend detektiert und quantifiziert werden kann. Für die qRT-PCR wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die eine Annealing-Temperatur von 60°C besaßen und zu einem Amplifikations-Produkt von 400 bis 1000 Basenpaaren führten. Alle Primer wurden von der Microsynth-AG (Balgach, Schweiz) hergestellt und sind in der Tabelle 7.1.9 aufgeführt. Die PCR-Zyklen erfolgten gemäß dem Protokoll SYBR® Green Select Master Mix (Life technologies, Darmstadt). Je 5 µl der cDNA wurden zusammen mit 5 mM der Oligonukleotide und 4,5 µl SYBR® Green Select Master Mix in einer 384-well-Platte vermischt und die Amplifizierung und Quantifizierung mit dem *HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) gestartet. Die Expression der Zielgene wurde in Relation zu dem *Houskeeping*-Gen GAPDH gesetzt und ist jeweils als Vielfaches der GAPDH-Expresion dargestellt. Für einige Versuche wurde statt SYBR® Green ein *TaqMan*-Assay verwendet, bei dem durch spezielle vorgefertigte Oligonukleotid-Sonden eine noch genauere Analyse der Genexpression ermöglicht wird. Die TaqMan-Sonden wurden von Applied Biosystems (Carlsbad, USA) gefertigt und sind in Tabelle 7.1.10 aufgeführt.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von denaturierenden Proteinlysaten

Die Zellen wurden gemäß 2.1.2 ausgesät und dem Experiment entsprechend stimuliert. Nach Ende der Stimulationszeit wurde das Zellmedium entfernt und die Zellen wie in 2.1.3 beschrieben in DLB-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren lysiert und anschließend geerntet. Die Proteine wurden durch 5-minütiges Aufkochen bei 95°C und mittels Ultraschallbehandlung (2x 5 Sekunden) denaturiert. Nach anschließender Zentrifugation (15 Minuten, 16.000 g, 4°C) wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Zellpellet mit den übrigen Zellfragmenten verworfen.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Konzentration der Proteine wurde mit Hilfe des Lowry Assays bestimmt (Dc-Protein Assay Kit, BioRad, München) [145]. Hierbei werden zunächst Kupfer-Protein-Komplexe in alkalischer Lösung gebildet. Diese reduzieren in einem zweiten Schritt ein Folin-haltiges Reagenz, wobei ein blauer Farbstoff entsteht, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Für die Messung wurde je 1 µl der Probe 1:10 in H₂O verdünnt und mit den Assay-Reagenzien versetzt. Die Absorption wurde bei 705 nm im Photometer (Tecan Infinite® F200 Pro, Tecan, Männedorf) gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand der Absorption einer BSA-Eichgerade berechnet.

2.3.3 Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-Page)

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden Proteine ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Proteine werden zunächst durch das anionische SDS in ihre Primärstruktur zerlegt und negativ geladen. Bestehende Disulfidbrücken können durch Hinzugabe von reduzierendem DTT (Dithiothreitol) aufgebrochen werden. Sobald eine elektrische Spannung angelegt wird, wandern die Proteine im Polyacrylamidgel in Richtung der Anode, wodurch sie lediglich ihrem Molekulargewicht nach und unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung voneinander getrennt werden. Zunächst wurde das Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel, wie in Tabelle 2.7 angezeigt hergestellt. Die Menge des verwendeten Acrylamids variierte je nach Größe der zu detektierenden Proteine, um so die Porengröße anzupassen. Zuerst wurde das Trenngel in die Gelhaltevorrichtung gegossen, wo es 30 Minuten lang auspolymerisierte. Als obere Schicht wurde das Sammelgel hinzugefügt und ein Kamm als Schablone für die Proteintaschen hineingesteckt. Nach 30 Minuten, in denen das Gel vollständig auspolymerisieren konnte, wurde das Gel in der Laufkammer befestigt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Trenngel					Sammelgel	
	Größe des Zielproteins [kDa]					
	50-200	30-120	20-100	10-60		
Bis-Ac-rylamid	7,5 % 2,5 ml	10 % 3,35 ml	12 % 4 ml	15 % 5 ml	Bis-Ac-rylamid	3 % 0,3 ml
Aqua bidest	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml	Aqua bidest	1,95 ml
4x Trenn-gel-puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	4x Sammel-gelpuffer	0,75 ml
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	TEMED	3 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	10% APS	30 µl

Die verwendeten Proteinlysate wurden in einer Konzentration von 1,5 µg/µl verdünnt und mit 5x SDS versetzt. Nach 5-minütigem Aufkochen bei 95°C wurden 15 µl des Lysats in eine Lauftasche gegeben. Als Standard für das Molekulargewicht der Proteine dienten 5 µl des Proteinmarkers *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermetas, St. Leon-Rot). Zunächst wurden die Proteine nach Anlegen eines elektrischen Feldes (300 V, 15 mA pro Gel, 300 W, 30 Minuten) im Sammelgel konzentriert (PP 3000 High Voltage Power Pack, Biometra) und hiernach im Trenngel anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (300 V, 30 mA pro Gel, 300 W, 45-75 Minuten).

2.3.4 Western Blot

Nach der Auftrennung des Proteingemisches werden die Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Immun-Blot PVDF-Membran (Millipore) übertragen, wo sie anschließend mit einem Antikörper detektiert werden können. Die Membran wurde zunächst für 10 Sekunden in Methanol aktiviert, 5 Minuten in Aqua bidest. neutralisiert und schließlich 5 weitere Minuten im Anodenpuffer 1 aufbewahrt. Es wurde ein Blot-Sandwich aus in Puffer getränkten Filterpapieren (Anodenpuffer 1, Anodenpuffer 2), der aktivierten PVDF-Membran, dem Polyacrylamidgel und einem weiteren Filterpapier (Kathodenpuffer) gebaut und die Luftblasen mit einem Roller entfernt. Das Blotten erfolgte in einer Blot-Kassette (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, München) bei 25 V, 0,1 A für 30-60 Minuten (in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Zielproteins). Im Anschluss wurde die Membran in ein mit TTBS gefülltes Röhrchen überführt und für 5 Minuten gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurde

die Membran hiernach für eine Stunde in TTBS mit 5% BSA bzw. 5% Magermilchpulver (MMP) inkubiert.

2.3.5 Antikörper-Inkubation und Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels zweier Antikörperreaktionen. Zunächst wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit einem Primärantikörper, der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet ist, inkubiert und 3 x 15 Minuten bei Raumtemperatur in TTBS gewaschen. Ein Sekundärantikörper, gerichtet gegen die Tierspezies des Primärantikörpers und an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, wurde für 1 Stunde hinzugegeben und die Membran erneut 3 x 30 Minuten in TTBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% BSA bzw. 5% MMP. Die Proteinbanden wurden mit einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Freiburg) sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran zwischen zwei Folien gebettet und mit 1 ml ECL-Lösung (Amersham ECL, GE Healthcare, Freiburg) benetzt. Dieses bewirkt in Anwesenheit der Meerrettichperoxidase eine Lichtreaktion, die sich auf dem Röntgenbild als schwarze Bande darstellen lässt. Nach dreiminütiger Inkubation in einem abgedunkeltem Raum wurde das überschüssige ECL entfernt und die Membran in einer Kassette mit dem Röntgenfilm bedeckt. Die Expositionszeit variierte je nach Antikörper zwischen 10 Sekunden und mehreren Minuten. Der Film wurde anschließend in der Entwicklermaschine (AGFA, Mortsel, Belgien) entwickelt. Bei sehr schwachen Banden wurde anstelle des ECL ein ECL-Plus-Reagenz (Amersham ECL Plus, GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Dieses basiert auf einer nicht-radioaktiven Methode, die eine starke und verlängerte Lichtemission produziert.

2.3.6 Membran-Stripping und Protein-Ladekontrolle

Um mehrere Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht auf derselben Membran darstellen zu können, müssen gebundene Antikörper nach der Filmentwicklung wieder gelöst werden. Dazu wurde die Membran in einem Röhrchen, gefüllt mit *Stripping*-Puffer und 400 µl β-Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 57°C inkubiert und anschließend mehrfach in TTBS gewaschen. Um sicherzustellen, dass in jeder Proteinprobe die gleiche Menge an Proteinen enthalten ist und die unterschiedliche Stärke von Banden nicht auf eine ungleiche Beladungsmenge zurückzuführen ist, muss im letzten Schritt eine Ladekontrolle mit einem sogenannten *Houskeeping*-Protein durchgeführt werden.

Dabei handelt es sich um ein Protein, das ubiquitär exprimiert wird und mit dem Proteingehalt der Probe korreliert. Als *Housekeeping*-Protein wurde β -Aktin verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 IL-6-Signalwege in humanen Kolonkarzinomzelllinien

Die folgenden Versuche wurden in humanen Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, LoVo, HCT-116 und SW480) durchgeführt und so die Rolle von IL-6 *Classic* und *Trans-Signaling* im intestinalen Epithel in-vitro betrachtet. Wie in der Einleitung dargestellt, wird der mIL-6R nicht auf allen Zellen des Körpers exprimiert. In Zellen, die den mIL-6R nicht besitzen, erfolgt eine Signaltransduktion von IL-6 demnach nur über die Bindung an den sIL-6R [146]. Im Zellversuch wurde hierfür das Designermolekül hIL-6 verwendet, das als Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-6R ausschließlich *Trans-Signaling* aktiviert.

3.1.1 *Classic* und *Trans-Signaling* aktivieren zeitabhängig den Jak/STAT3-Signalweg

Initial wurde überprüft, ob beide IL-6-Signalwege in den humanen Kolonkarzinomzelllinien HT-29, LoVo, HCT-116 und SW480 durch IL-6 und hIL-6 induzierbar sind. Relevant war hierbei insbesondere die Fragestellung, ob die Krebszelllinien den mIL-6R exprimieren, da nur so eine Signalübertragung über den klassischen IL-6-Signalweg erfolgen kann. Im ersten Schritt wurde eine Zeitkinetik mit IL-6 und hIL-6 in HT-29-Zellen erstellt und die Aktivierung von STAT3 im Western Blot untersucht. In unstimulierten Zellen liegt STAT3 in unphosphoryliertem Zustand vor. Beide IL-6-Signalwege können es via Phosphorylierung aktivieren [147]. Eine Stimulation mit IL-6 führte in Kolonkarzinomzellen zu einer zeitabhängigen Aktivierung von STAT3, die bereits nach 15 Minuten zu beobachten war und Maximalwerte zwischen 30 und 60 Minuten zeigte (Abb. 3.1A). Längere Inkubationen mit IL-6 ergaben weniger starke Banden von pSTAT3, jedoch zeigte sich auch nach einer sehr langen Stimulationsdauer von 72 Stunden noch residuelle STAT3-Aktivierung. Auch hIL-6 induzierte zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 3.1B). Im Vergleich zur IL-6-Zeitkinetik führte hIL-6 jedoch zu einer prolongierten STAT3-Aktivierung, die auch 12 Stunden nach Applikation des Zytokins noch als kräftige Bande im Western Blot nachweisbar war. Besonders prominent stellten sich die Banden nach 30 Minuten und 2 Stunden dar. Anders als in Folgeversuchen zeigte sich auch eine leichte Bande bei 86

kDa in Gegenwart von PBS, was am ehesten als Folge einer unspezifischen Antikörperbindung gewertet wurde. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass sowohl *Classic Signaling* (via IL-6) als auch *Trans-Signaling* (via hIL-6) in HT-29-Zellen induzierbar ist. Für die folgenden Western-Blot-Experimente wurde zur optimalen Beurteilung der STAT3-Aktivität eine Stimulationsdauer zwischen 30 und 60 Minuten verwendet.

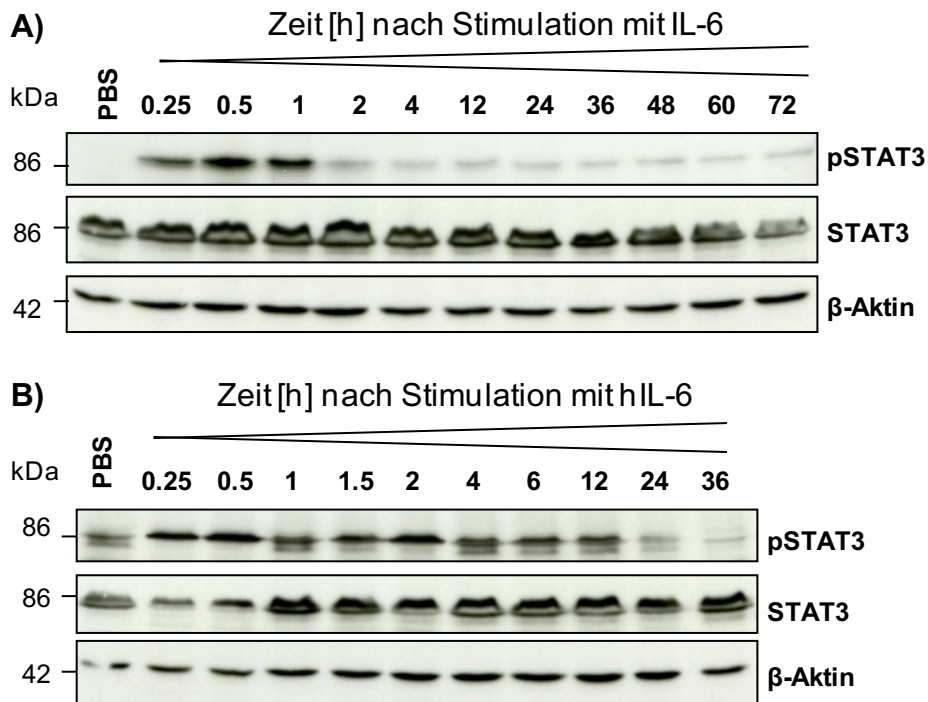


Abbildung 3.1: Zeitkinetik der IL-6- und hIL-6-vermittelten STAT3 Phosphorylierung in HT-29

HT-29 Zellen wurden über Nacht in nährstoffarmen Medium präinkubiert und **A)** mit humanem IL-6 [100 ng/ml] oder **B)** mit hIL-6 [100 ng/ml] zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert. Als Kontrolle dienten mit PBS behandelte Zellen. Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE (10% (v/v) Acrylamid) aufgetrennt und mittels Immunoblot mit Antikörpern gegen pSTAT3, STAT3 und β-Aktin analysiert.

Auch die übrigen humanen Kolonkarzinomzelllinien wurden anschließend auf die Existenz beider Signalwege getestet (Abb. 3.2). In allen drei Zelllinien (HCT-116, SW480 und LoVo) induzierte sowohl IL-6 als auch hIL-6 eine STAT3-Phosphorylierung.

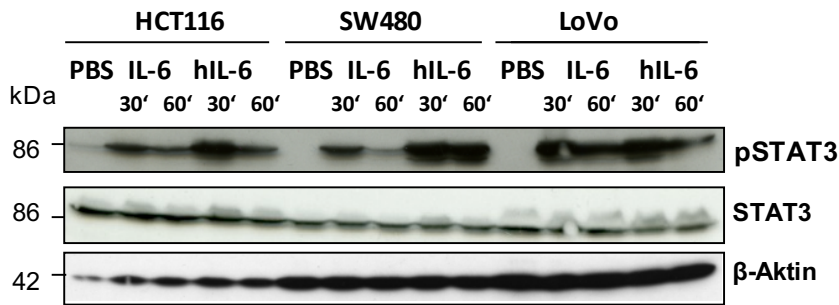


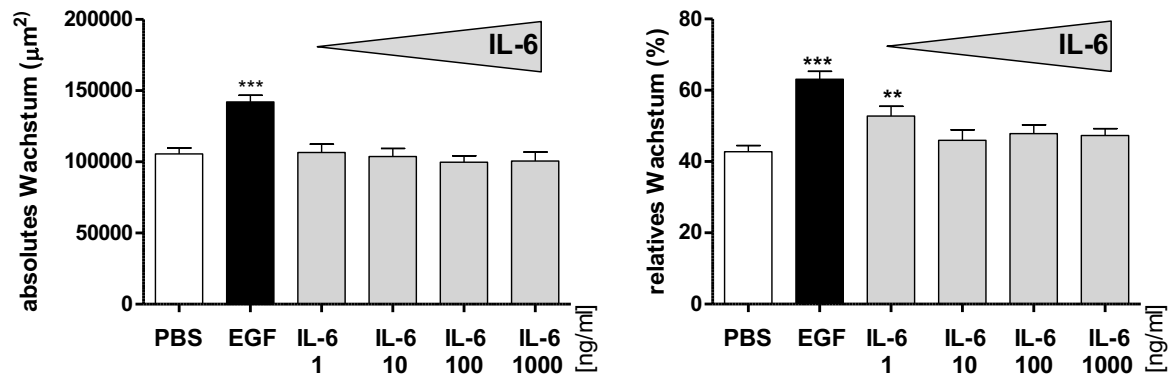
Abbildung 3.2: Induktion von *Classic* und *Trans-Signaling* in Kolonkarzinomzellen

HCT-116-, LoVo- und SW480-Zellen wurden nach Nährstoffreduktion mit IL-6 [100 ng/ml] oder hIL-6 [100 ng/ml] für 30 bzw. 60 Minuten stimuliert. Nach Aufarbeitung der Proben wurden die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Es erfolgte die Detektion von pSTAT3 und STAT3.

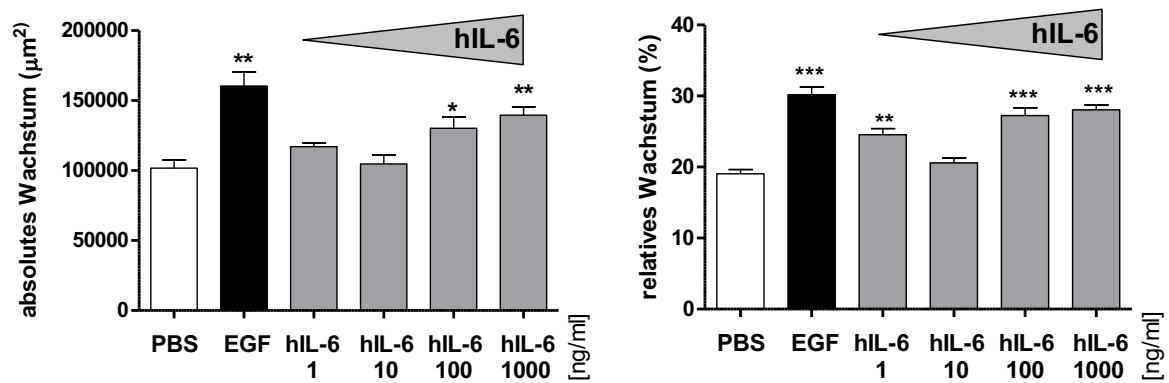
3.1.2 Epitheliale Wundheilung wird nur durch *Trans-Signaling* verstärkt

Um die Rolle von *Classic* und *Trans-Signaling* in der intestinalen Wundheilung näher zu charakterisieren, wurde ein Wundheilungsversuch in HT-29 Zellen durchgeführt. Dabei wurden aufsteigende Konzentrationen von IL-6 bzw. hIL-6 gewählt, um auf diese Weise zu ermitteln, ob höhere Zytokinkonzentrationen zu verstärkter Migration und Proliferation führten. Als Positivkontrolle diente humanes EGF, dessen wundheilungsfördernde Wirkung bereits ausführlich beschrieben wurde [148]. Die Wundfläche wurde direkt nach Wundherzeugung und 24 Stunden später unter dem Mikroskop bestimmt und das absolute und das relative Wachstum daraus ermittelt. In allen Stimulationsansätzen inklusive der Negativkontrolle war eine Abnahme der Wundfläche innerhalb von 24 Stunden zu beobachten (Abb. 3.3). Eine Inkubation mit EGF bewirkte eine signifikant höhere Wachstumsrate. Anders als initial vermutet, führte eine Stimulation mit IL-6 selbst in sehr hoher Dosis nicht zu einer beschleunigten Wundheilung (Abb. 3.3A). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Applikation von hoch dosiertem hIL-6 (100 und 1000 ng/ml) eine signifikante Zunahme des Zellwachstums (Abb. 3.3B).

A)



B)



C)

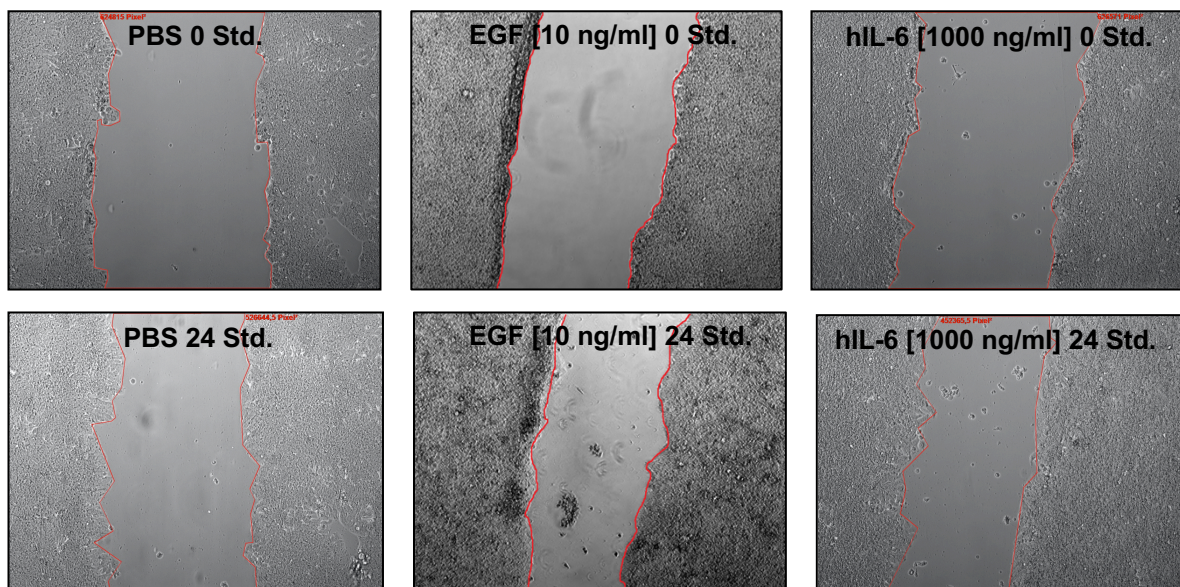


Abbildung 3.3: Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Effekt von IL-6, hIL-6 und EGF auf die epitheliale Wundheilung

HT-29 Zellen wurden nach Präinkubation in nährstoffarmem Medium mit einer Pipette verwundet (2 Wunden/well) und in aufsteigenden Konzentrationen [1; 10; 100; 1000 ng/ml] **A)** mit IL-6 und **B)** dem Designer-Protein hIL-6 für 24 Stunden stimuliert. EGF [10 ng/ml] wurde als Positivkontrolle verwendet. Die epitheliale Wundheilung ist jeweils als absolutes und als relatives Wachstum nach 24 Stunden dargestellt. (Mittelwert \pm SD, A) n=16, B) n=8, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.005$); **C)** Mikroskopische Darstellung der Wundfläche direkt nach Verwundung und 24 Stunden später

Um die Wachstumsdynamik der Karzinomzellen in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer zu bestimmen, wurde ein weiterer Wundheilungsversuch mit EGF [10 ng/ml] und hIL-6 [100 ng/ml] über einen längeren Zeitraum von insgesamt 48 Stunden durchgeführt. Dieser führte zu zwei Beobachtungen: Zum einen zeigte sich, dass sowohl hIL-6 als auch EGF noch nach 48 Stunden einen proliferativen Effekt vermittelten und damit langfristig das Zellwachstum beeinflussten (Abb. 3.4A). Desweiteren wurde sichtbar, dass in allen Ansätzen einschließlich der Negativkontrolle das stärkste Wachstum pro Zeit in den ersten Stunden nach der Läsion stattfand und die Wachstumskurve über die Zeit zunehmend abflachte. Das bedeutet, dass die Wachstumsgeschwindigkeit umso geringer wurde, je länger die Inkubation andauerte und je stärker die Wunde verschlossen war. Zudem wurde untersucht, ob sich die Genexpression von epithelialen und mesenchymalen Markern änderte, sobald die Läsion gesetzt und die Zytokine IL-6 und hIL-6 appliziert wurden. Hierbei wurde deutlich, dass *Trans Signaling*, aber nicht *Classic Signaling* eine verminderte Expression des epithelialen Markergens E-Cadherin (CDH1) bewirkte, wohingegen die mesenchymalen Marker ZEB1, SNAIL und SLUG stärker exprimiert wurden (Abb. 3.4B). Von den zuletzt genannten war aber nur SNAIL signifikant erhöht.

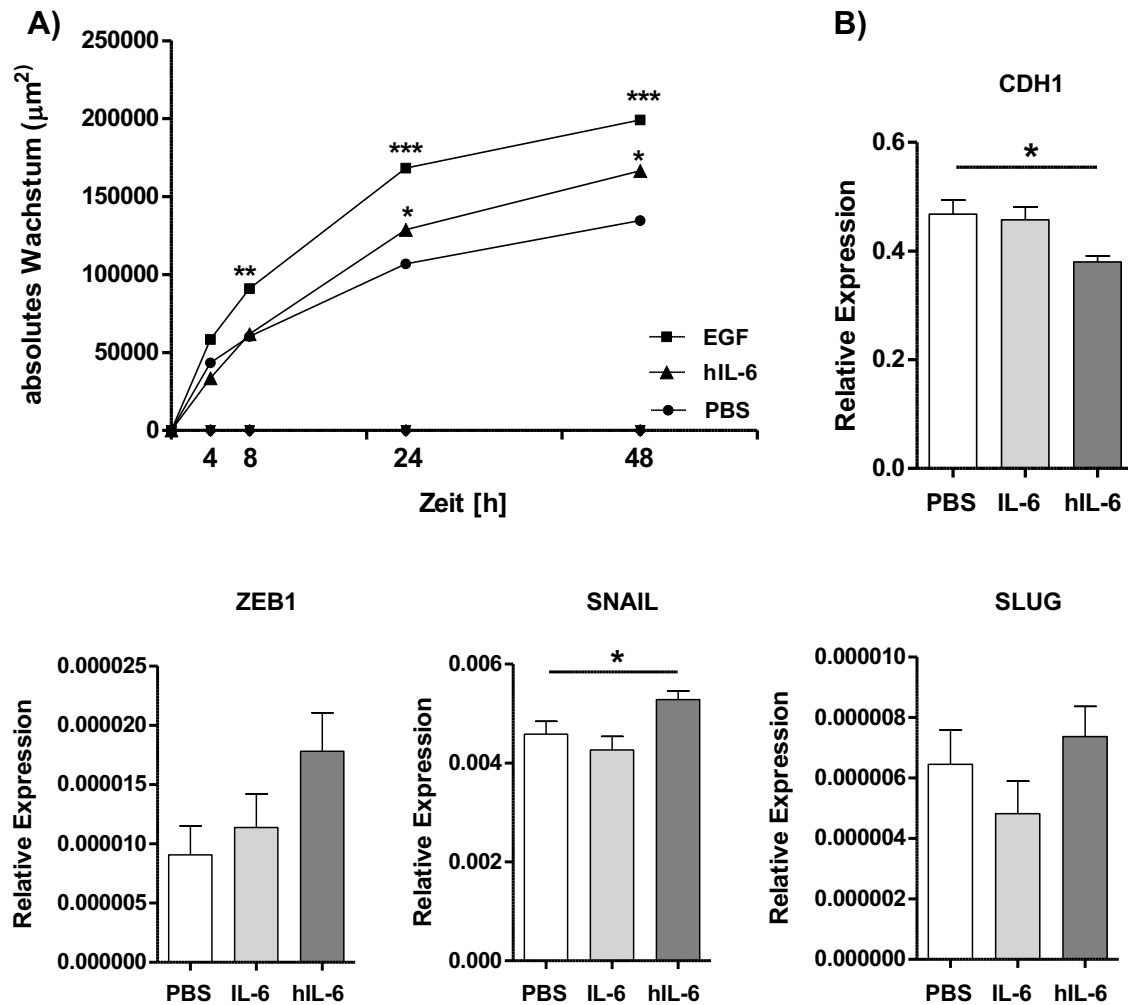


Abbildung 3.4: Zeitabhängiges Wachstum von Kolonkarzinomzellen und EMT

A) In HT-29 Zellen wurden zwei Wunden pro *well* gesetzt und anschließend mit PBS, EGF [10 ng/ml] oder hIL-6 [100 ng/ml] stimuliert und für 48 Stunden inkubiert. Das absolute Wachstum der Epithelzellen wurde nach 4, 8, 24 und 48 Stunden bestimmt. **B)** HT-29 Zellen wurden für 6 Stunden mit IL-6 [100 ng/ml] und hIL-6 [100 ng/ml] stimuliert und aus den Zelllysaten die RNA isoliert. Die Expression der EMT-Marker wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt und im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH dargestellt. (Mittelwert \pm SD, n=6, * = p<0.05; ** = p<0.01, *** = p<0.005)

3.1.3 IL-6 Inhibition hat keinen Einfluss auf die die endogen induzierte Wundheilung

Im Wundheilungsversuch wurde deutlich, dass auch die Wundfläche in den Negativkontrollen ohne einen weiteren externen Wachstumsstimulus innerhalb der 24 Stunden abnahm, da das Nährmedium vor Beginn der Wundheilungsversuche durch ein nährstoffarmes Medium ersetzt wurde. Als Ursache für diese Beobachtung wäre denkbar, dass das Setzen der Läsion zu einer autokrinen Sekretion von Wachstumsfaktoren

ren führt. Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Wachstumsfaktoren um Bestandteile der IL-6-Kaskade handelt, wurde ein Wundheilungsexperiment unter medikamentöser Hemmung von *Classic* und *Trans-Signaling* durchgeführt.

Zunächst wurde die Wirksamkeit der verwendeten Inhibitoren im Western Blot getestet. Es wurde eine Titration des monoklonalen IL-6R-Antikörpers Tocilizumab und des Fusionsproteins sgp130Fc mit anschließender Induktion beider IL-6-Signalwege vorgenommen. Während Tocilizumab beide Wege hemmt, bindet sgp130Fc spezifisch an den Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R und beeinflusst damit nur *Trans-Signaling* [149]. HT-29-Zellen wurden für 6 Stunden mit den Inhibitoren präinkubiert und die IL-6-Signalwege durch IL-6 und hIL-6 induziert. Im Western Blot zeigte sich, dass nur Tocilizumab eine IL-6-vermittelte STAT3-Phosphorylierung inhibierte, während sgp130Fc hierauf keinen Einfluss besaß (Abb. 3.5A). Im Gegensatz dazu hemmte ausschließlich sgp130Fc dosisabhängig die Wirkung von hIL-6 (Abb. 3.5B). Tocilizumab stellte sich in der Zellkultur somit als selektiver Hemmstoff von IL-6-induziertem *Classic-Signaling* dar, während sgp130Fc spezifisch hIL-6 inhibierte.

Anschließend wurde ein Wundheilungsversuch mit den Inhibitoren Infliximab (IFX), Tocilizumab (TCZ) und sgp130Fc durchgeführt (Abb. 3.5C/D). Der TNF α -Inhibitor Infliximab wurde aufgrund der umfassenden Datenlage zu seiner antientzündlichen Wirkung als Kontrollantikörper verwendet. Während Infliximab das absolute Wachstum der Kolonkarzinomzellen leicht verminderte, zeigten weder sehr hohe Konzentrationen von Tocilizumab noch sgp130Fc einen Einfluss auf die Regeneration der Wundfläche.

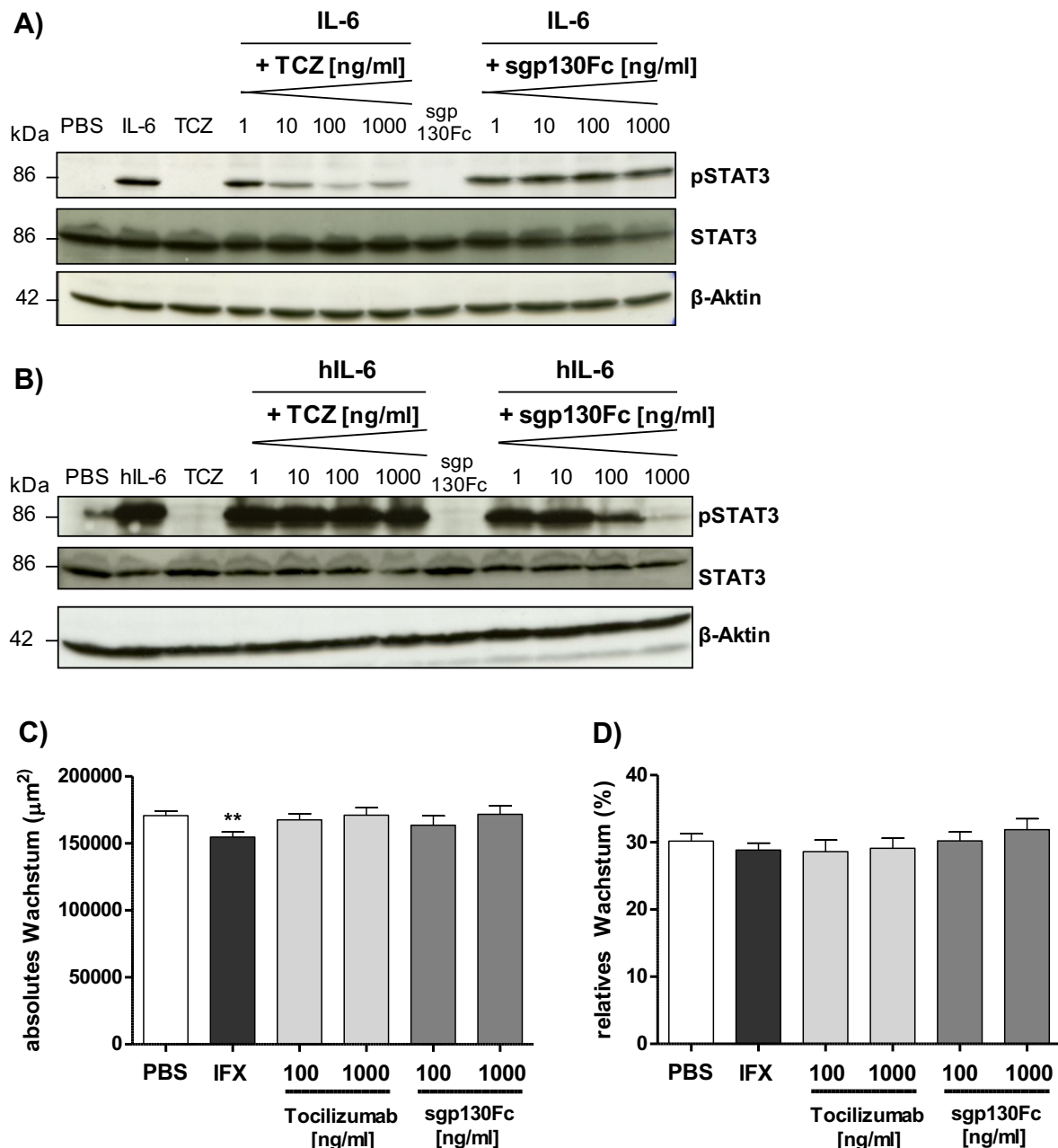


Abbildung 3.5: Dosis-abhängige Inhibition der IL-6 Signalwege mit monoklonalen Antikörpern

A/B) HT-29 Zellen wurden für 6 Stunden mit den Inhibitoren Tocilizumab [1-1000 ng/ml] und sgp130Fc [1-1000 ng/ml] vorstimuliert. *Classic Signaling* wurde durch IL-6 [100 ng/ml] aktiviert (**A**), *Trans-Signaling* durch hIL-6 [10 ng/ml] (**B**). Die Proteine wurden durch eine SDS-PAGE (10% (v/v) Acrylamid) aufgetrennt und mittels Immunoblot wurden pSTAT3, STAT3 und β-Aktin detektiert. **C/D)** In HT-29 Zellen wurden pro *well* zwei Wunden gesetzt und die Zellen mit PBS, Infliximab [100 ng/ml], Tocilizumab [100; 1000 ng/ml] oder sgp130Fc [100; 1000 ng/ml] stimuliert und 24 Stunden inkubiert. **C)** zeigt das absolute Wachstum nach 24 Stunden, in **D)** ist das relative Wachstum dargestellt. (Mittelwert ± SD, n=8, * = p<0.05; ** = p<0.01)

3.1.4 Sgp130Fc reduziert den Einfluss von hIL-6 auf die Regeneration der Wundfläche

Da sich gezeigt hatte, dass *Trans-Signaling* im Gegensatz zu *Classic Signaling* einen regenerativen Stimulus im Wundheilungsversuch darstellte, wurde im Folgenden untersucht, ob das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling* mittels medikamentöser Inhibition aufgehoben werden konnte. HT-29-Zellen wurden dafür 6 Stunden lang mit Tocilizumab oder sgp130Fc präinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit hIL-6 stimuliert. Sowohl im absoluten als auch im relativen Wachstum wurde sichtbar, dass sgp130Fc, nicht jedoch Tocilizumab, die proliferative Wirkung von *Trans-Signaling* verhinderte (Abb. 3.6).

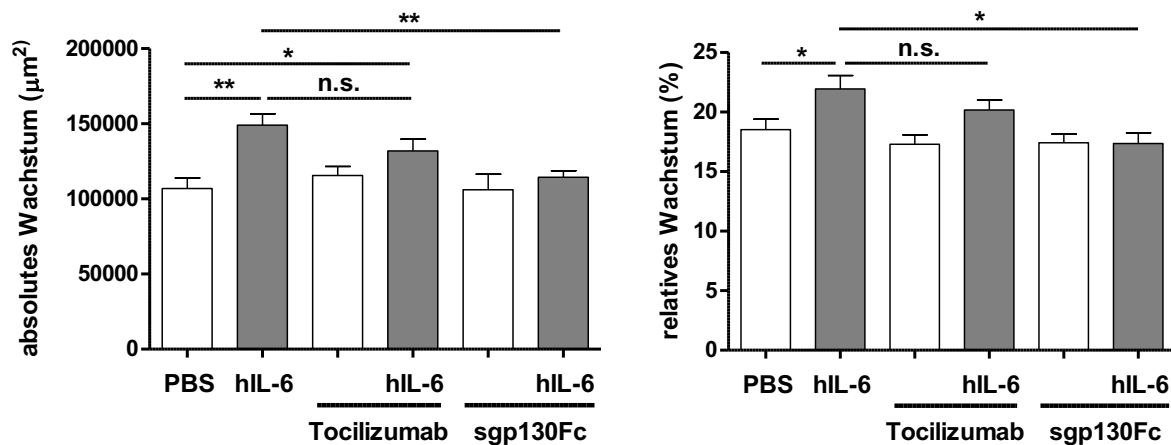


Abbildung 3.6: Inhibition der durch hIL-6 induzierten Wundheilung mittels sgp130Fc

HT-29 Zellen wurden für 6 Stunden mit Tocilizumab [1000 ng/ml] und sgp130Fc [1000 ng/ml] vorstimuliert. In jedem *well* wurden zwei Wunden gesetzt und anschließend PBS oder hIL-6 [100 ng/ml] hinzugefügt. Dargestellt sind das absolute Wachstum und das relative Wachstum nach 24h Inkubation. (Mittelwert \pm SD, n=8, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, n.s. = nicht signifikant)

3.1.5 Inhibition von STAT3 hat einen geringen Einfluss auf das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling*

Es stellte sich die Frage, ob das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling* durch einen STAT-3-abhängigen Mechanismus vermittelt wurde. Hierzu wurden weitere STAT3-aktivierende Zytokine im Wundheilungsversuch getestet [119, 120]. Im Western Blot konnte sowohl nach 30 als auch nach 60 Minuten eine STAT3-Aktivierung durch die Zytokine IL-6, hIL-6, IL-11 und IL-22 [100 ng/ml] nachgewiesen werden (Abb. 3.7A). Jedoch hatten nur hIL-6 und IL-22 einen positiven Einfluss auf die Regeneration

der Wundfläche nach 24 Stunden (Abb. 3.7B), während IL-6 und IL-11 keine wachstumsfördernden Effekte vermittelten. Als molekularbiologisches Korrelat stellte sich die pSTAT3-Aktivierung im Western Blot durch diese Zytokine nur marginal dar.

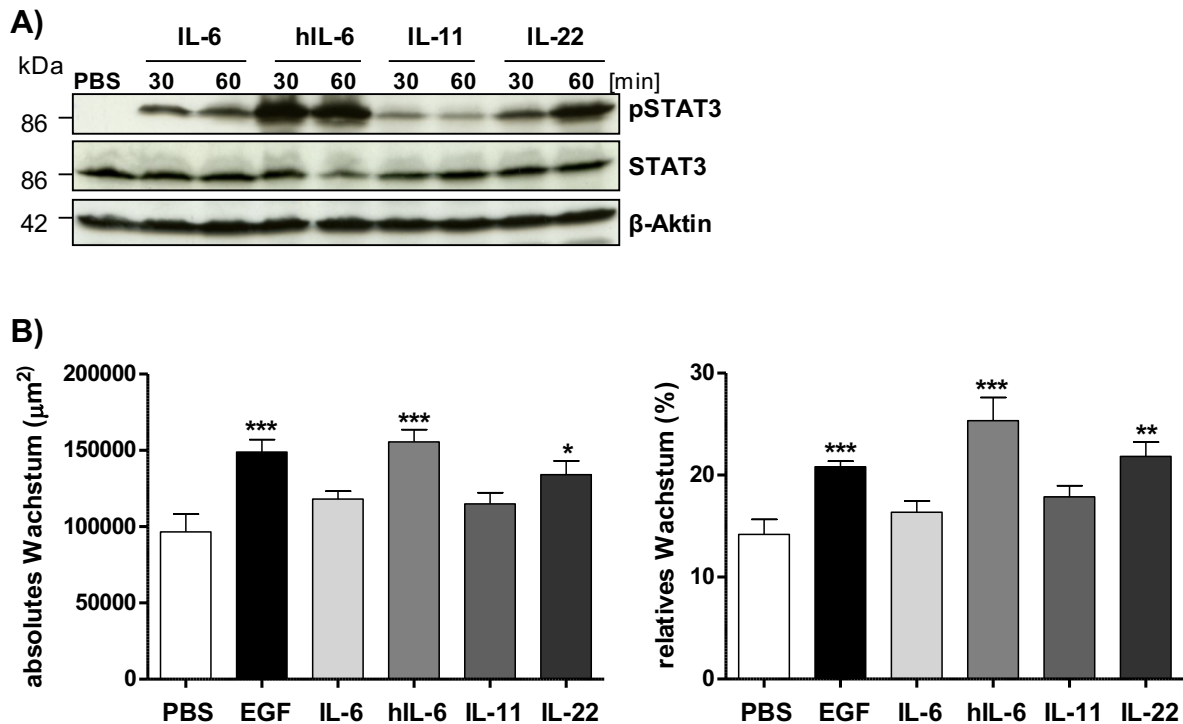


Abbildung 3.7: Einfluss von STAT3-induzierenden Zytokinen auf die epitheliale Wundheilung

A) In HT-29 Zellen wurde der JAK/STAT-Weg über IL-6 [100 ng/ml], hIL-6 [100 ng/ml], IL-11 [100 ng/ml] oder IL-22 [100 ng/ml] aktiviert. Die Ernte erfolgte nach je 30- und 60-minütiger Stimulation. Nach Separation der Proteine in einer SDS-PAGE (10% (v/v) Acrylamid) wurden pSTAT3, STAT3 und β-Aktin mittels Immunoblot detektiert. **B)** Die proliferative Wirkung von STAT3 wurde im Wundheilungs-Assay untersucht. In einem konfluenten Monolayer von HT-29 Zellen wurden zwei Wunden pro *well* gesetzt und die Zellen mit PBS, IL-6 [100 ng/ml], hIL-6 [100 ng/ml], IL-11 [100 ng/ml] oder IL-22 [100 ng/ml] stimuliert und 24 Stunden inkubiert. Dargestellt sind das absolute Wachstum und das relative Wachstum nach 24 Stunden (Mittelwert \pm SD, $n=8$, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

Um zu testen, ob *Trans-Signaling* über eine verstärkte STAT3-Aktivität proliferative Effekte vermittelte, wurde die STAT3-Aktivierung mit dem Inhibitor S3I-201 unterbunden und anschließend der Einfluss der STAT3-Inhibition (iSTAT3) auf die Regeneration der Wundfläche untersucht. Als Referenzinhibitoren dienten Tocilizumab und sgp130Fc. HT-29-Zellen wurden für 4 Stunden mit den Inhibitoren präinkubiert und nach mechanischer Verwundung wurde *Trans-Signaling* induziert (Abb. 3.8). Nach 24 Stunden zeigte sich analog zum Vorversuch eine spezifische Inhibition des regenera-

tiven Potenzials von *Trans-Signaling* mittels sgp130Fc. Ausschließliche STAT3-Inhibition hatte keinen Einfluss auf die Regeneration der Wundfläche. Im Folgenden zeigte sich jedoch eine Diskrepanz zwischen absolutem und relativem Wachstum. Während eine medikamentöse Hemmung von STAT3 den regenerativen Effekt von hIL-6 in absoluten Zahlen nicht beeinträchtigte, war die Wundheilung relativ gesehen vermindert, wenn STAT3 vor der Induktion von *Trans-Signaling* inhibiert wurde. Allerdings zeigte sich im relativen Wachstum, diskordant zu den vorangegangenen Untersuchungen, auch bei intakter STAT3-Funktion kein wachstumsfördernder Effekt durch die Induktion von *Trans-Signaling*.

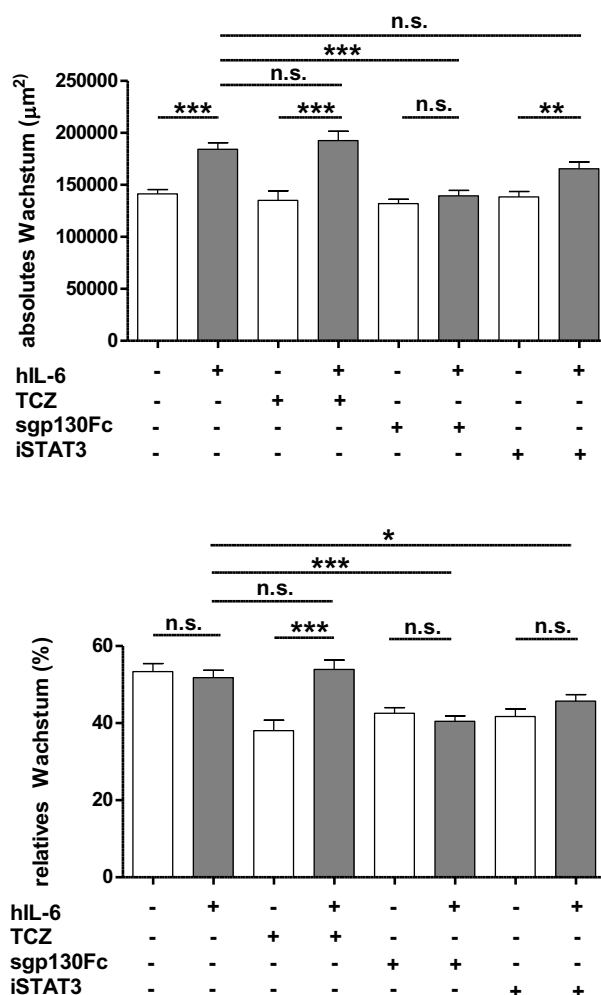


Abbildung 3.8: Einfluss von STAT3-Inhibition auf die epitheliale Wundheilung

HT-29-Zellen wurden für 4 Stunden mit Tocilizumab [1 µg/ml], sgp130Fc [1 µg/ml] oder dem STAT3-Inhibitor S3I-201 [10 µM] vorstimuliert und in jedem *well* drei Wunden gesetzt. Für 24 Stunden wurden sie anschließend mit PBS oder hIL-6 [100 ng/ml] inkubiert und das Wachstum bestimmt. Dargestellt sind das absolute und das relative Wachstum. (Mittelwert ± SD, n=18, * = p<0.05; ** = p<0.01, *** = p<0.005, n.s. = nicht signifikant)

3.2 IL-6-Signalwege in intestinalen Epithelzellen von IL-6R^{ΔIEC}

In den bisher durchgeführten Versuchen wurde der Einfluss der beiden IL-6-Signalwege in genetisch veränderten Kolonkarzinomzelllinien untersucht. Um Aussagen über den Einfluss von IL-6 im physiologischen Darmepithel treffen zu können, wurden die folgenden Versuche in primären Mausenterozyten durchgeführt. Auch hier sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob *Classic* und *Trans-Signaling* im intestinalen Epithel existieren und welchen Einfluss die Signalwege auf Regenerationsprozesse besitzen.

3.2.1 Nur *Trans-Signaling* aktiviert STAT3 in intestinalen Epithelzellen

Um die Funktion von *Classic-* und *Trans-Signaling* in primären Epithelzellen zu untersuchen, wurden konditionale Knockoutmäuse verwendet, die den mIL-6R im intestinalen Epithel nicht exprimieren. In diesen sogenannten IL-6R^{ΔIEC}- Mäusen ist ausschließlich *Classic-Signaling* im Darmepithel ausgeschaltet. *Trans-Signaling* hingegen erfolgt weiterhin mittels *Shedding* des mIL6R, den IL-6R^{ΔIEC}- Mäuse in den übrigen Geweben exprimieren. Werden intestinale Epithelzellen der IL-6R^{ΔIEC}- Mäuse in Monokulturen untersucht, existiert die alternative IL-6-Signaltransduktion über *Trans-Signaling* nicht, da murine intestinale Epithelzellen den sIL-6R nicht erzeugen können [149].

IL-6R^{flox}-Mäuse hingegen besitzen in-vivo beide Signalwege, während in kultivierten Darmepithelzellen ohne künstlich hinzugefügten sIL6R nur *Classic Signaling* erfolgt. Auf diese Weise kann die spezifische Funktion von *Classic Signaling* untersucht werden.

Tabelle 3.1: Induzierbarkeit der IL-6-Signalwege im intestinalen Epithel von IL-6R^{flox}- und IL-6R^{ΔIEC}-Mäusen mittels Applikation von IL-6

	<i>Classic Signaling</i>	<i>Trans-Signaling</i>
IL-6R ^{flox}	induzierbar	induzierbar
IL-6R ^{ΔIEC}	nicht induzierbar	induzierbar

Tabelle 3.2: Induzierbarkeit der IL-6-Signalwege in Zellkulturen mit murinen intestinalen Epithelzellen extrahiert aus IL-6R^{flox}- und IL-6R^{ΔIEC}-Mäusen mittels Applikation von IL-6

	<i>Classic Signaling</i>	<i>Trans-Signaling</i>
IL-6R ^{flox}	induzierbar	nicht induzierbar
IL-6R ^{ΔIEC}	nicht induzierbar	nicht induzierbar

IL-6R^{ΔIEC}-Mäuse unterschieden sich in ihrem Phänotyp nicht von gleichaltrigen Artgenossen. Körpergewicht, Milz- und Lebergewicht sowie Dünn- und Dickdarmlänge waren im Vergleich zu IL-6R^{flox}-Mäusen nicht verändert (Abb. 3.9A). Von IL-6R^{ΔIEC}- und IL-6R^{flox}-Mäusen wurden wie in 2.1.6 beschrieben intestinale Epithelzellen isoliert und in Nährmedium kultiviert. Nach einer Stunde Ruhezeit wurden sie für 30 Minuten mit PBS, IL-6, hIL-6 oder IL-22 (je 100 ng/ml) stimuliert und die Aktivierung von STAT3 wurde mittels Western Blot bestimmt. Es zeigten sich in allen Stimulationsansätzen keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, jedoch sah man eine verstärkte STAT3-Phosphorylierung in den Zellen, die mit hIL-6 oder mit IL-22 stimuliert wurden (Abb. 3.9B). In der Kontrollgruppe und in den mit IL-6 behandelten Zellen waren lediglich basale Level von pSTAT3 zu detektieren.

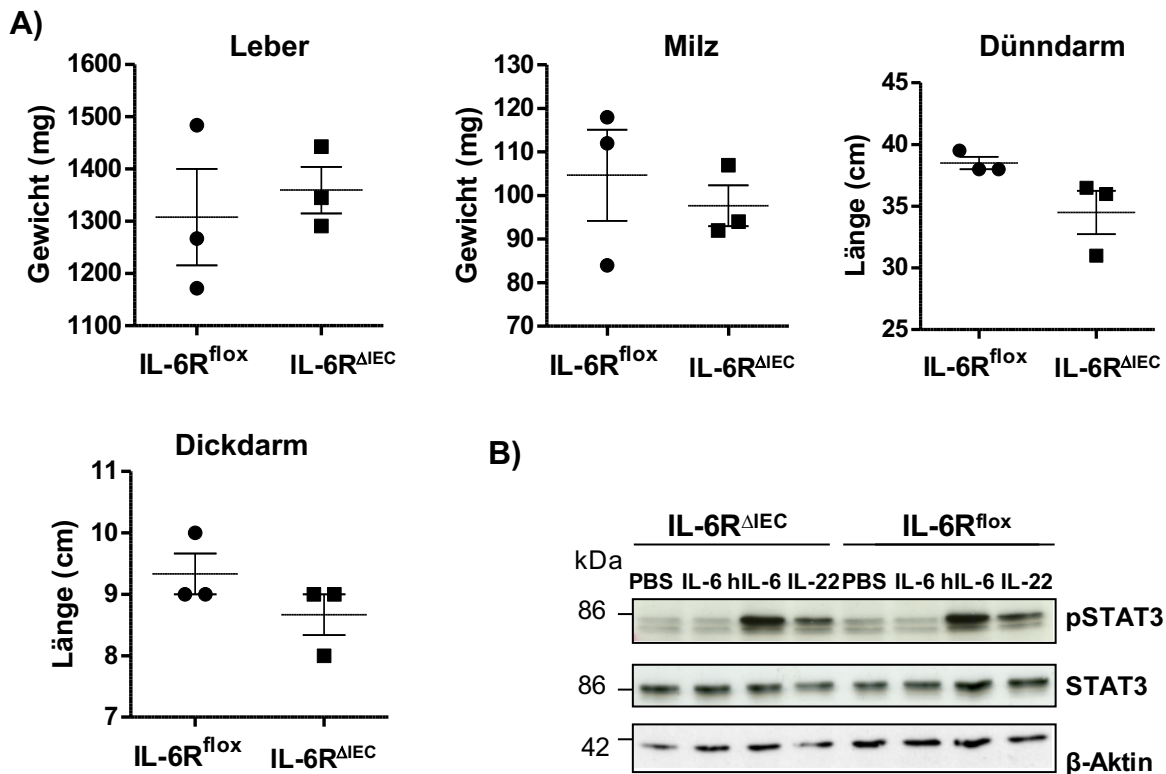


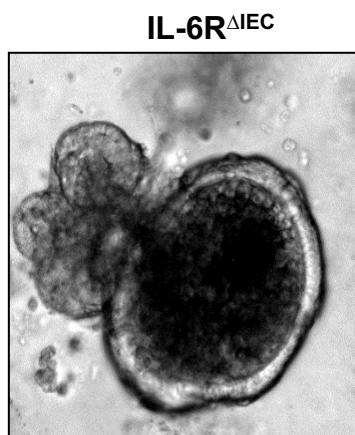
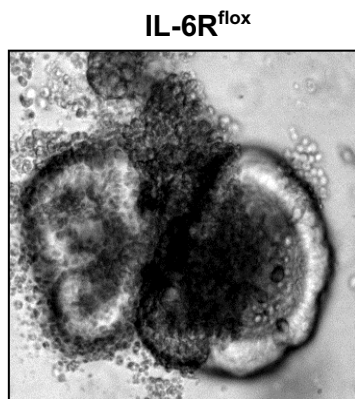
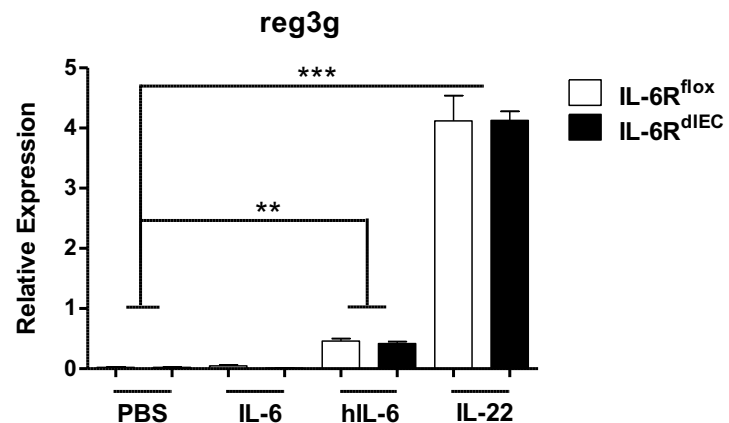
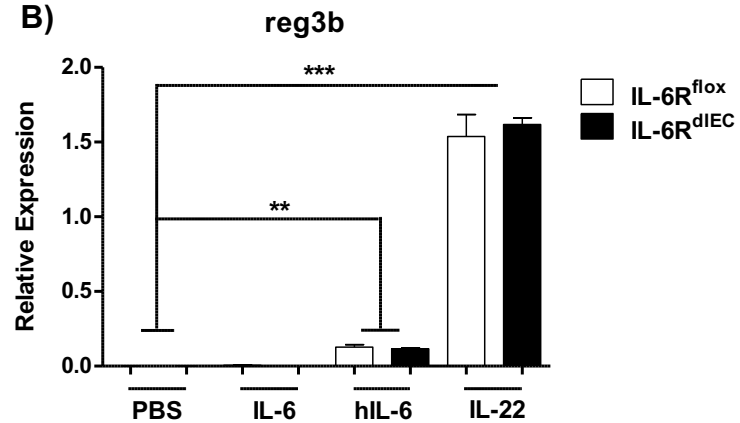
Abbildung 3.9: Basale Phänotypisierung von IL-6R^{ΔIEC}

A) Basale Phänotypisierung von 12-14 Wochen alten IL-6R^{ΔIEC}-Mäusen und gleichaltrigen IL-6R^{flox}-Artgenossen (n=3), **B)** Murine intestinale Epithelzellen von IL-6R^{ΔIEC}- und IL-6R^{flox}-Mäusen wurden isoliert und 30 Minuten mit PBS, IL-6 [100 ng/ml], hIL-6 [100 ng/ml] oder IL-22 [100 ng/ml] stimuliert. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden pSTAT3, STAT3 und β-Aktin mittels Immunoblot detektiert.

3.2.2 IL-6 induziert keine STAT3-Antwort in intestinalen Organoiden

Um die IL-6-Signalwege in einem physiologischeren Kontext zu betrachten, wurden Organoiden aus IL-6R^{ΔIEC} und IL-6R^{flox} erzeugt. Dabei handelt es sich um Miniaturdärme, die mithilfe der Wachstumsfaktoren EGF, R-Spondin-1 und Noggin aus Dünndarmkrypten gezüchtet werden können. Eingebettet in Matrigel haben die in den Krypten enthaltenen Stammzellen sowohl die Fähigkeit zur Proliferation als auch zur Differenzierung, sodass die ausknoappenden Organoiden in ihrer Architektur dem differenzierten intestinalen Epithel ähneln [150]. Im Vergleich zu in vitro-Versuchen mit epithelialen Tumorzellen spiegeln sie das physiologische Milieu in-vivo deutlich genauer wider. Für den folgenden Versuch wurden intestinale Organoiden aus Krypten von IL-6R^{ΔIEC} und korrespondierenden IL-6R^{flox}-Mäusen gezüchtet, um so den spezifischen Einfluss von *Classic Signaling* im intestinalen Epithel zu untersuchen. Dünndarmkrypten wurden, wie in den Kapiteln 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben, isoliert und in Matrigel

kultiviert. Das Nährmedium wurde jeden 2. Tag erneuert. Am 10. Tag wurden die entstandenen Organoiden beider Genotypen mit murinem IL-6, hIL-6, oder IL-22 für 6 Stunden stimuliert. Mikroskopisch waren keine Unterschiede in der Formation oder im Wachstum der Organoiden zwischen den Genotypen oder den einzelnen Stimulationsansätzen zu erkennen (Abb. 3.10A). Da alle drei Zytokine im Zellversuch STAT3 aktivieren konnten, wurde daraufhin mittels *Real-Time-PCR* die STAT3-Antwort gemessen. Die Analyse der STAT3-Zielgene ergab, dass hIL-6 und IL-22, nicht aber IL-6 die Expression von *reg3b* und *reg3g* induzierten (Abb. 3.9B). Zwischen den beiden Genotypen gab es keinerlei Unterschiede. Zudem wurde beobachtet, dass selbst in den Organoiden der IL-6R^{flox}-Mäuse, die den mIL-6R besaßen, IL-6 keinen Einfluss auf die Genexpression der STAT3-Zielgene hatte.

A) Tag 6 vor Passage**B)****Abbildung 3.10: Expression von STAT3-Genen in Organoiden aus Dünndarmkrypten**

Intestinale Organoiden von IL-6R^{flox} und IL-6R^{ΔIEC} wurden wie zuvor beschrieben kultiviert und 10 Tage lang mit EGF [100 ng/ml], Noggin [10 ng/ml] und R-Spondin [250 ng/ml] stimuliert. Die Konfiguration der sich bildenden Organoiden wurde unter dem Mikroskop beobachtet und dokumentiert und das Kulturmedium jeden Tag erneuert. Am 6. Tag **(A)** wurden die Organoiden passagiert und in einem Verhältnis von 1:2 erneut ausgesät. Das Kulturmedium wurde am 10. Tag durch ein nährstoffarmes Medium ersetzt und die Organoiden beider Genotypen mit murinen IL-6 [100 ng/ml], hIL-6 [100 ng/ml], oder IL-22 [100 ng/ml] für 6 Stunden stimuliert. **B)** Die Expression von den STAT3-Zielgenen reg3b und reg3g wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt und im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen β -Aktin dargestellt. (Mittelwert \pm SD, n=8, * = p<0.05; ** = p<0.01, *** = p<0.005)

3.3 Bedeutung der IL-6-Signalwege für ER-Stress und Wundheilung

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es eine Assoziation zwischen der Entstehung von CED und chronischem Stress im Endoplasmatischen Retikulum. Der Transkriptionsfaktor XBP1 wurde als Risikogen für M. Crohn identifiziert und wird auf einen Stressreiz hin durch das ER aktiviert [58]. STAT3 wiederum wurde im Zusammenhang mit chronischem ER-Stress und epithelialer Wundheilung in Verbindung gebracht [59].

Es sollte daher im Folgenden untersucht werden, ob die IL-6-Signalwege über die Induktion von STAT3 mit ER-Stress und der daraus entstehenden *Unfolded Protein Response* in Verbindung stehen und welchen Effekt die Induktion von ER-Stress auf das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling* in intestinalen Epithelzellen besitzt.

3.3.1 *Trans-Signaling* aktiviert die *Unfolded Protein Response*

In HT-29-Zellen wurde *Classic* oder *Trans-Signaling* durch Stimulation mit IL-6 bzw. hIL-6 induziert. Die Expression der Gene, die die UPR repräsentieren, wurde mithilfe von *RT-PCR*-Analysen näher betrachtet und die Effekte beider IL-6-Signalwege miteinander verglichen. Als Referenz diente IL-22, welches ebenfalls STAT3 aktiviert, um somit Rückschlüsse auf die Rolle von pSTAT3 zu ziehen. Es wurde deutlich, dass HT-29-Zellen, wurden sie mit IL-6 oder IL-22 behandelt, die aktivierte Variante des Transkriptionsfaktors XBP1 verstärkt exprimierten (Abb. 3.11). Sowohl die Expression von *gesplicedem* XBP1 als auch das Verhältnis von sXBP1 zu Gesamt-XBP1 war signifikant erhöht, welches die Aktivität der Endoribonuklease IRE1 widerspiegelt. IL-6 hingegen induzierte keine XBP-1 vermittelte UPR. In den anderen beiden Zweigen der UPR, hier repräsentiert durch ATF4 und CHOP, waren zwischen allen Ansätzen der STAT3-aktivierenden Zytokine und der Negativkontrolle keine Unterschiede zu beobachten.

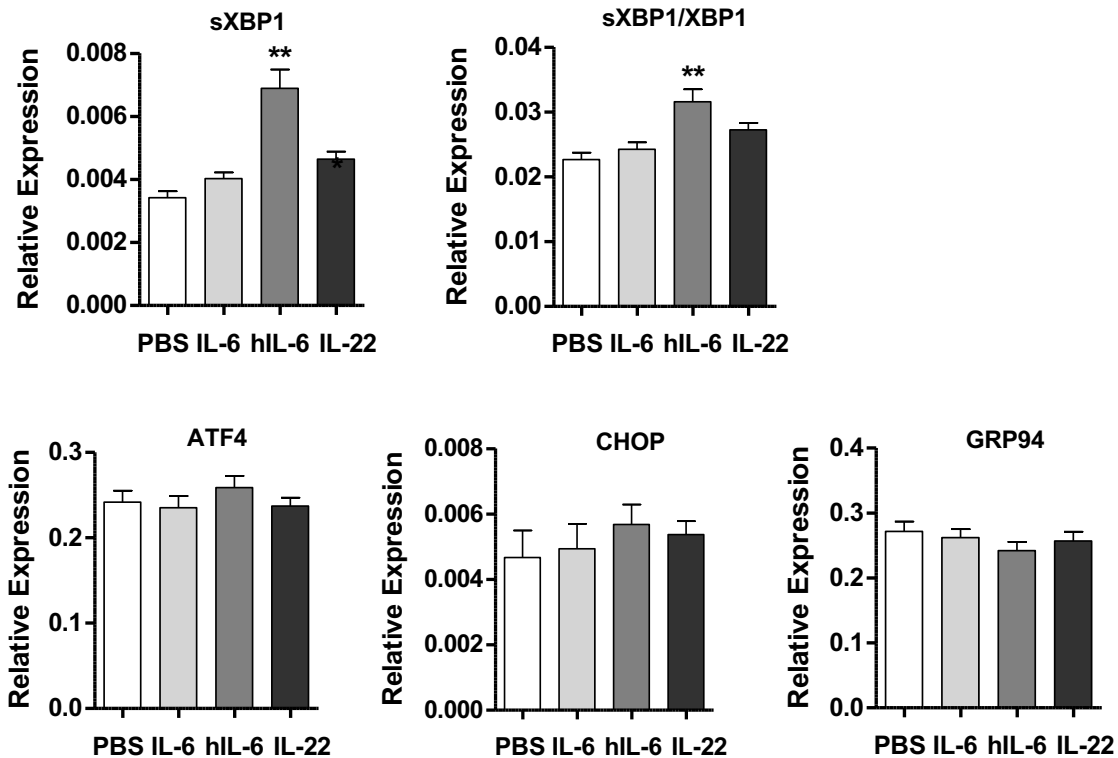


Abbildung 3.11: Expression von UPR-Genen nach Induktion von *Classic* und *Trans-Signaling*

HT-29 Zellen wurden für 6 Stunden mit IL-6 [100 ng/ml], hIL-6 [100 ng/ml] und IL-22 [100 ng/ml] stimuliert und aus den Zelllysaten die RNA isoliert. Die Expression der ER-Stress-Marker wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt und im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH dargestellt. (Mittelwert \pm SD, n=6, * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.005$)

ER-Stress vermittelt, wie in der Einleitung dargestellt, über Induktion der UPR vorwiegend antiproliferative Effekte. Dass *Trans-Signaling*, dessen wachstumsförderndes Potenzial in den vorigen Versuchen gezeigt wurde, gleichzeitig die Expression von antiproliferativen ER-Genen hochregulierte, erschien zunächst widersprüchlich. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich durch *Trans-Signaling* und zusätzlicher chemischer Induktion von ER-Stress ein pro- oder ein antiproliferativer Effekt vermitteln ließ. Hierzu wurde in einem weiteren Wundheilungsversuch *Classic*, *Trans-Signaling* oder keiner der beiden Signalwege induziert. Zusätzlich wurde entweder mittels Tunicamycin chemischer ER-Stress erzeugt oder eine Negativkontrolle mit DMSO verwendet. Zunächst stellte sich heraus, dass die Wundheilung in jedem Stimulationsansatz mit Tunicamycin im Vergleich zur Negativkontrolle verringert war (Abb. 3.12). Der proliferative Effekt von *Trans-Signaling* konnte durch zusätzliche Induktion von ER-Stress vollständig aufgehoben werden. Es zeigte sich sogar ein synergistischer Effekt durch gleichzeitige Applikation von hIL-6 und Tunicamycin, sodass die Wundheilung

in diesen Zellen am geringsten ausfiel. Ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich zwischen hIL-6 plus Tunicamycin und PBS plus Tunicamycin jedoch nicht.

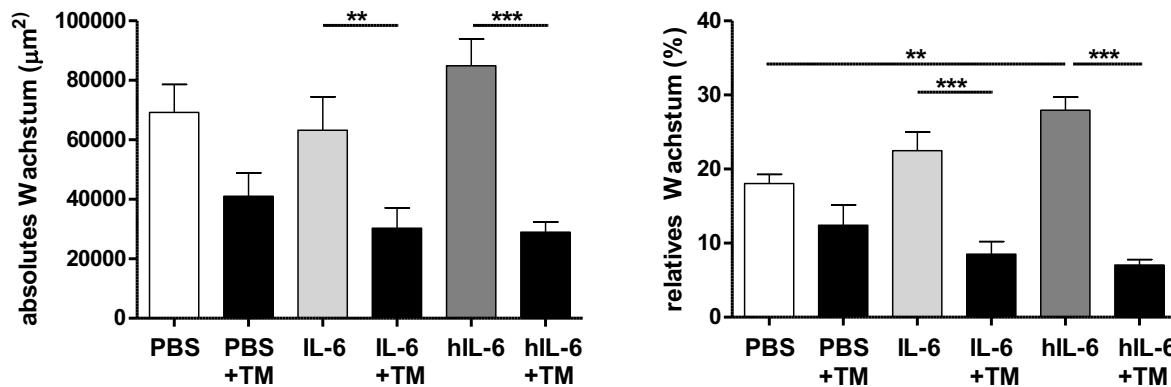


Abbildung 3.12: Epitheliale Wundheilung nach simultaner Induktion von *Classic* bzw. *Trans-Signaling* und ER-Stress

In HT-29 Zellen wurde pro *well* zwei Wunden gesetzt und mit PBS, IL-6 [100 ng/ml] oder hIL-6 [100 ng/ml] stimuliert. Zusätzlich wurde in der Hälfte der Fälle Tunicamycin [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] appliziert und in die übrigen *wells* die gleiche Menge an DMSO hinzugefügt und für 24 Stunden inkubiert. **A)** zeigt das absolute Wachstum nach 24 Stunden und **B)** das relative Wachstum. (Mittelwert \pm SD, $n=8$, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

3.3.2 Persistierender ER-Stress vermindert die epitheliale Wundheilung

Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich die Hypothese, dass hIL-6 bei einfacher Applikation zwar einen Einfluss auf die Expression von ER-Markern besitzt, der hervorgerufene ER-Stress jedoch nicht ausreicht, um das Wundwachstum negativ zu beeinflussen. Um zu testen, ob *Trans-Signaling* einen so starken ER-Stress erzeugen kann, dass die Wundheilung dadurch eingeschränkt wird, wurden Kolonkarzinomzellen über einen langen Zeitraum von insgesamt 72 Stunden alle 24 Stunden erneut mit IL-6 oder hIL-6 vorstimuliert (Abb. 3.13A). Nach mechanischer Läsion der Zellschicht und Applikation der Zytokine wurde in der Hälfte der Fälle chemischer ER-Stress mittels Tunicamycin erzeugt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Es zeigte sich, dass eine repetitive Induktion von *Trans-Signaling* die zuvor beobachtete proliferative Wirkung von hIL-6 verringerte (Abb. 3.13B). Ob dieser Effekt auf der wiederholten Induktion von *Trans-Signaling* oder der protrahierten Stimulationsdauer beruhte, blieb unklar. Tunicamycin verminderte die Wundheilung signifikant. Es wurde insbesondere sichtbar, dass eine repetitive Induktion von *Trans-Signaling* die Wirkung von Tunicamycin potenzierte und die Zellen sogar schädigte, sodass die Wundfläche bei

72-stündiger Inkubation mit hIL-6 zunahm. Wurde hIL-6 ein einziges Mal appliziert und anschließend Tunicamycin hinzugefügt, hatte *Trans-Signaling* weder einen pro- noch einen antiproliferativen Effekt.

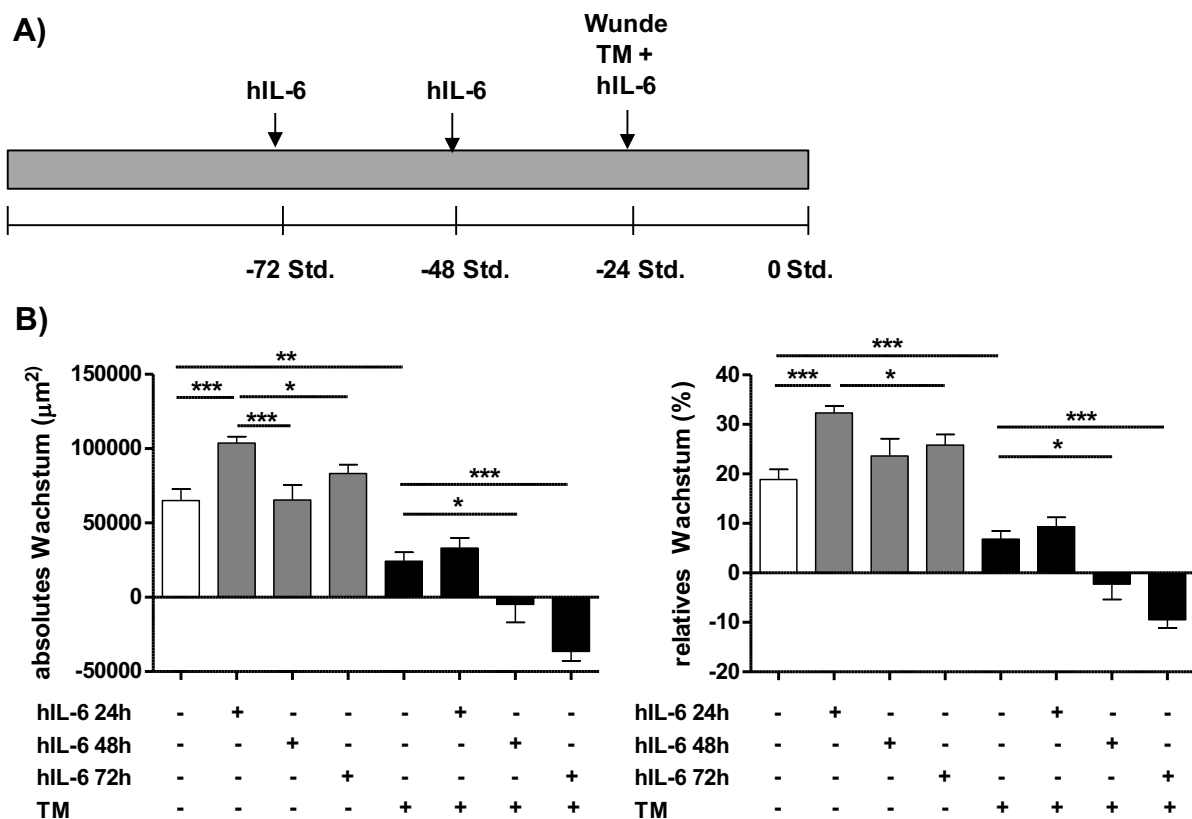


Abbildung 3.13: Epitheliale Wundheilung nach repetitiver Induktion von *Trans-Signaling* und ER-Stress

A) Stimulationsschema: HT-29 Zellen wurden insgesamt 3 Mal für je 24 Stunden mit hIL-6 [100 ng/ml] vorstimuliert. Vor der 3. Applikation wurden in jedem *well* drei Wunden gesetzt und je die Hälfte der Ansätze zusätzlich mit Tunicamycin [1 $\mu\text{g/ml}$] bzw. DMSO stimuliert und für weitere 24 Stunden inkubiert. **B)** absolutes und relatives Wachstum nach 24 Stunden). (Mittelwert \pm SD, $n=18$, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

Die quantitative *Realtime-PCR* ergab einen starken Anstieg der ER-Stress-Marker aller drei UPR-Zweige sowohl durch repetitive Induktion von *Trans-Signaling* als auch durch Applikation von Tunicamycin (Abb. 3.14). Die simultane Anwendung beider Verfahren vermittelte einen synergistischen Effekt und verstärkte die Expression zusätzlich. Besonders in der Expression von *gesplicedem* XBP1 und von GRP94 sah man einen zeitabhängigen Anstieg.

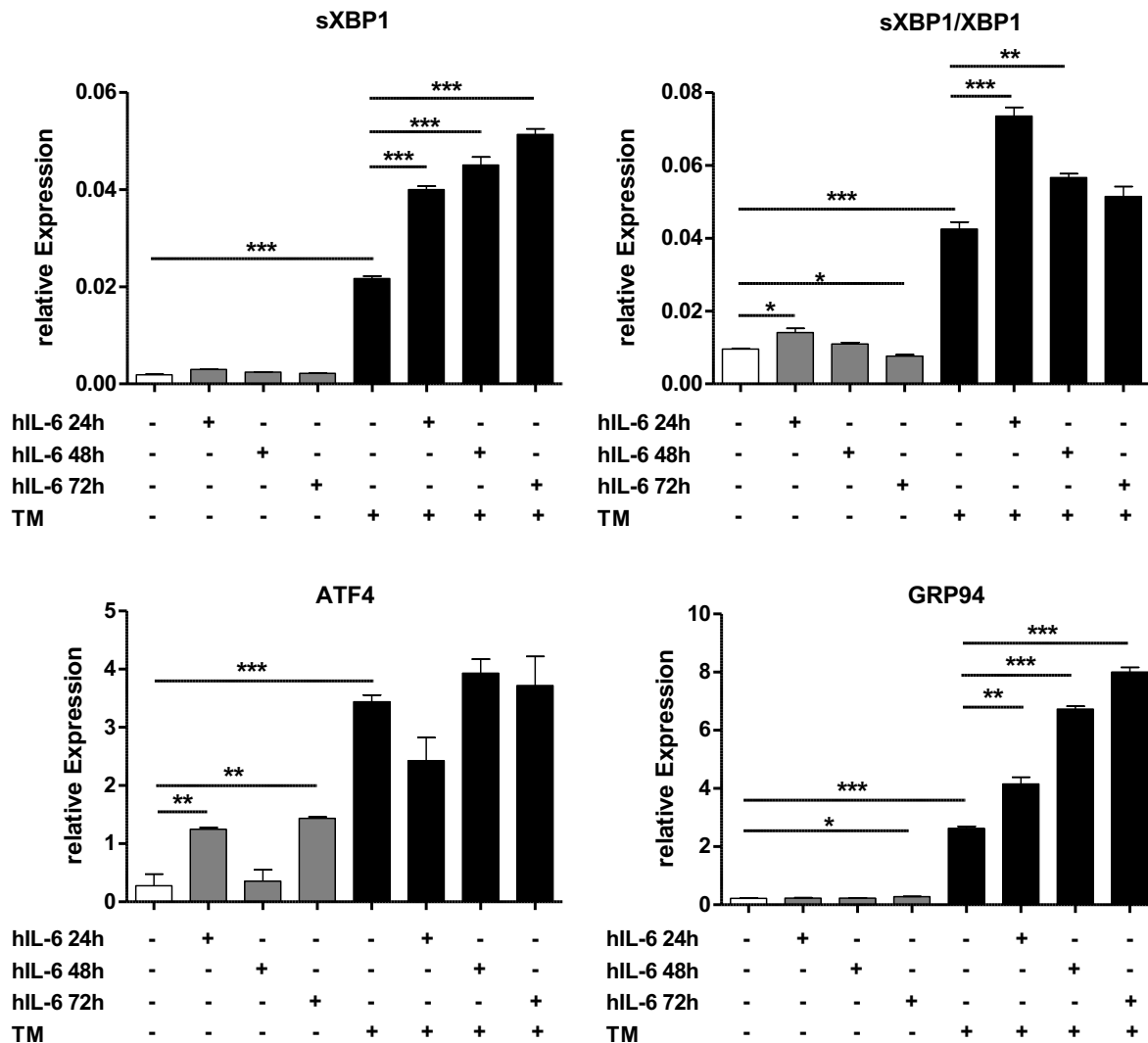


Abbildung 3.14: Expression von UPR-Genen nach repetitiver Induktion von *Trans-Signaling*

Die in Abbildung 3.13 im *Scratch Assay* verwendeten Kolonkarzinomzellen wurden lysiert und die Expression der ER-Stress-Marker wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt und im Verhältnis zu dem *Housekeeping-Gen* GAPDH dargestellt. (Mittelwert \pm SD, $n=3$, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

Um festzustellen, ob dieser Effekt nur durch *Trans-Signaling* oder generell durch IL-6-abhängige STAT3-Aktivierung vermittelt wird, wurde der gleiche Versuch mit IL-6 durchgeführt und so die Rolle des klassischen Signalweges untersucht (Abb. 3.15A). Repetitive Stimulation mit IL-6 hatte dabei keine Auswirkung auf die Wundheilung (Abb. 3.15B). Auch nach 72-stündiger Vorstimulation zeigte sich kein Unterschied zur Negativkontrolle. Anders als in Vorexperimenten gezeigt, vermittelte Tunicamycin in

diesem Versuch einen starken antiproliferativen Effekt und verhinderte die Regeneration der Läsionen vollständig. In den bisherigen Versuchen hatte es das Zellwachstum lediglich vermindert. Bei repetitiver Induktion von *Classic Signaling* und anschließender chemischer Induktion von ER-Stress zeigte sich auch hier ein synergistischer, antiproliferativer Effekt mit einer Zunahme der Wundfläche nach 24 Stunden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Zellen in diesem Versuch offenbar besonders sensibel auf externe Stressoren reagierten, was am ungewöhnlichen Negativwachstum nach der Applikation von Tunicamycin sichtbar wird. Trotzdem war der synergistische Effekt von *Classic-Signaling* und Tunicamycin, verglichen mit dem Effekt von *Trans-Signaling* im Parallelversuch, geringfügig ausgeprägt.

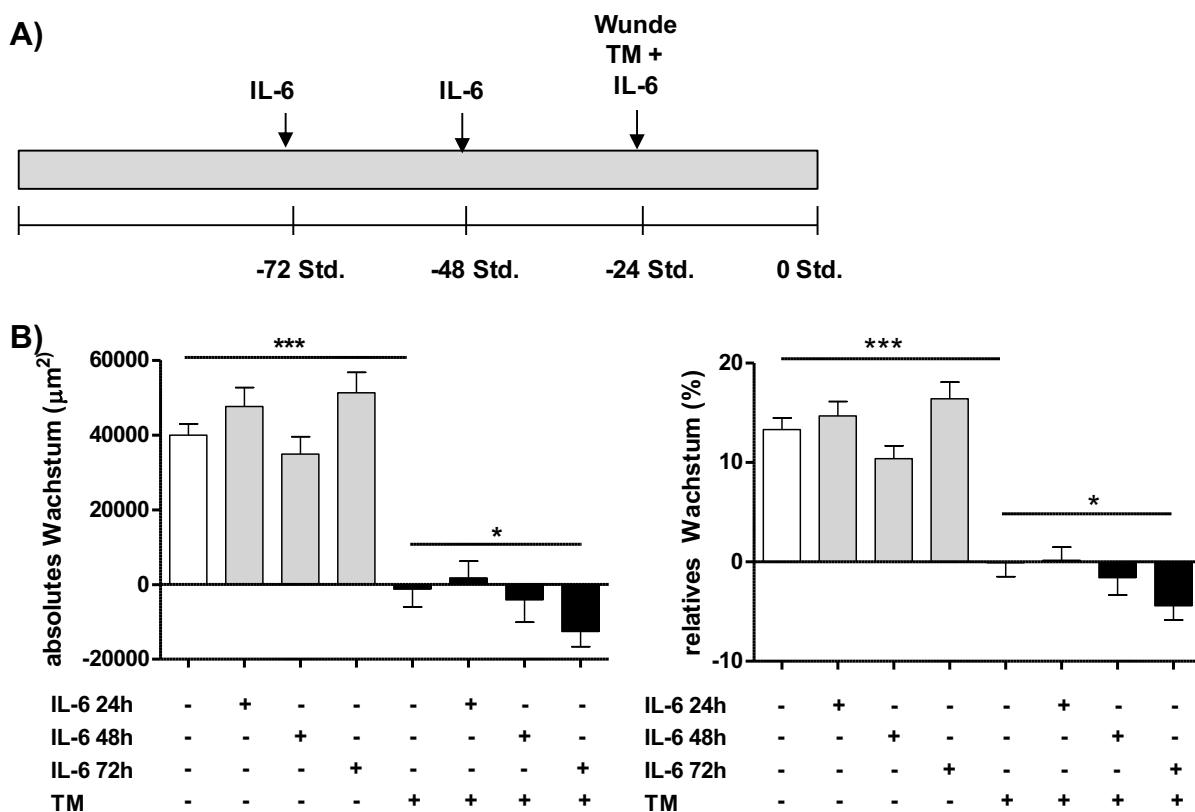


Abbildung 3.15: Epitheliale Wundheilung nach simultaner repetitiver Induktion von *Classic Signaling* und ER-Stress

A) Stimulationsschema: HT-29 Zellen wurden insgesamt 3 Mal für 24 Stunden mit IL-6 [100 ng/ml] stimuliert. Vor der 3. Applikation wurden in jedem *well* drei Wunden gesetzt und in je der Hälfte der Ansätze zusätzlich chemischer ER-Stress mit Tunicamycin [1 µg/ml] erzeugt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente die gleiche Menge DMSO. **B)** zeigt das absolute und relative Wachstum 24 Stunden nach Verwundung. (Mittelwert \pm SD, n=18, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

In der RT-PCR zeigte sich wiederum ein Anstieg der UPR-Marker als Ausdruck des chemisch erzeugten ER-Stresses durch Tunicamycin in allen drei Branchen der UPR (sXBP1, ATF4 und GRP94) (Abb. 3.16). Im Gegensatz zum Vorversuch mit hIL-6 war nur ein geringfügiger Effekt durch die zusätzliche Induktion von *Classic Signaling* zu beobachten, auch wenn IL-6 mehrfach und über einen langen Zeitraum appliziert wurde. Lediglich die Expression von *gesplicetem* XBP1 war nach 24- und nach 72-stündiger Inkubation mit IL-6 plus Tunicamycin erhöht, was für eine verstärkte Aktivität der IRE1 spricht. Der Quotient aus sXBP1 und Gesamt-XBP1 war dadurch aber nicht verändert. Diese Ergebnisse sind kongruent zu der Beobachtung, dass die repetitive Stimulation mit IL-6 nur einen relativ geringen Einfluss auf die epitheliale Wundheilung zeigte.

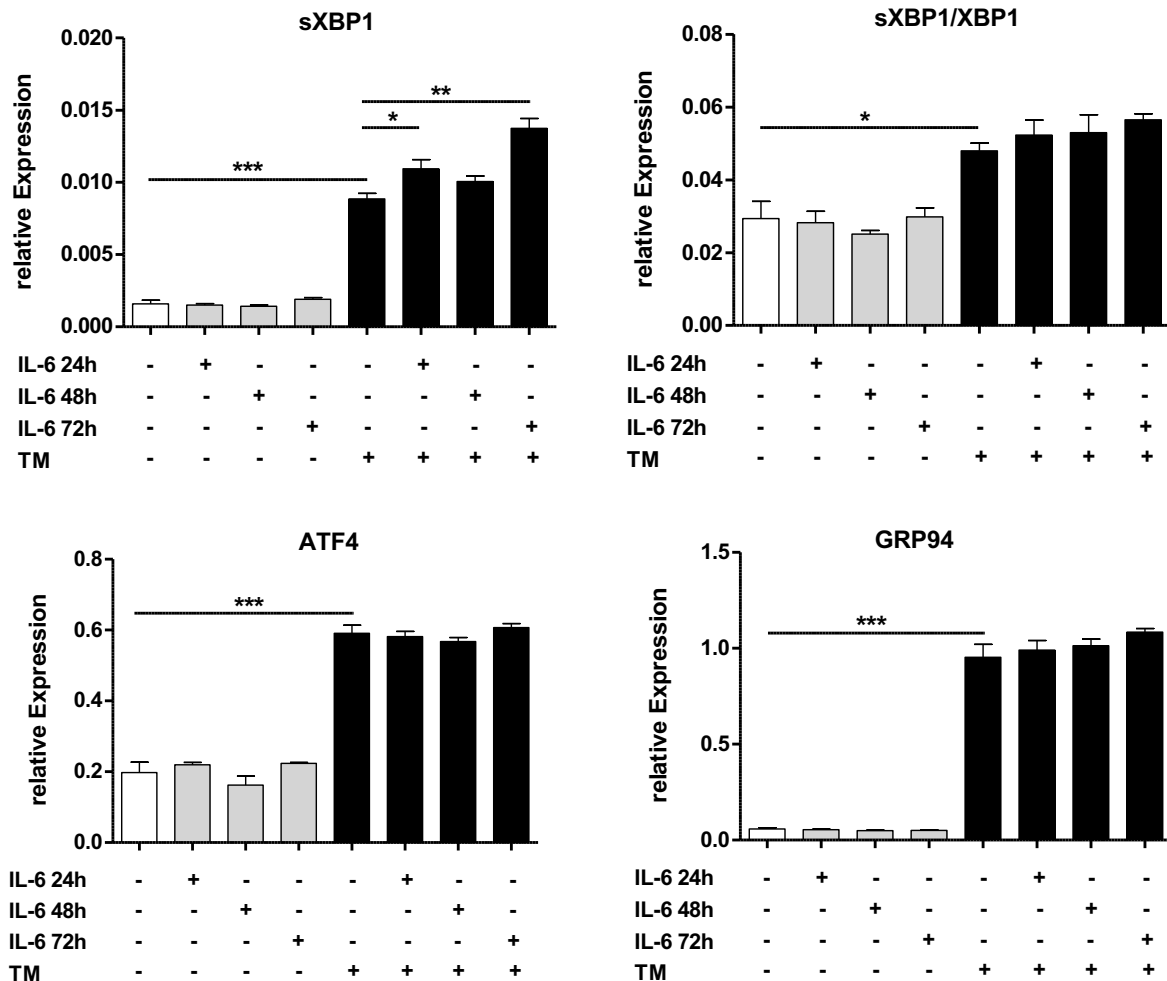


Abbildung 3.16: Expression von UPR-Genen nach repetitiver Induktion von *Classic Signaling*

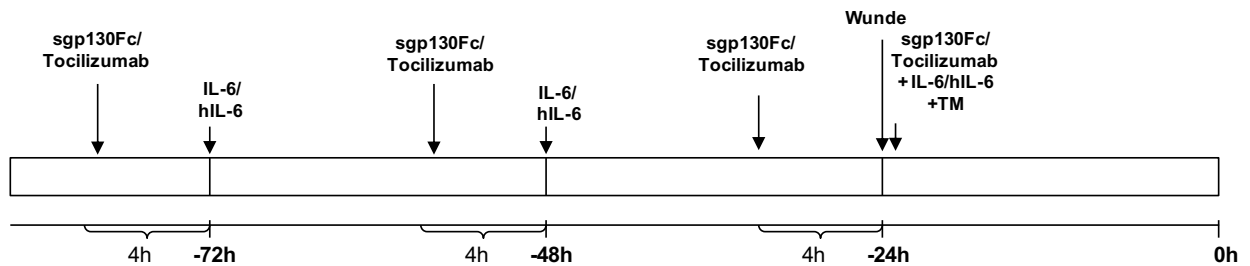
Die in Abbildung 3.15 im *Scratch Assay* verwendeten Kolonkarzinomzellen wurden lysiert und die Expression der ER-Stress-Marker wurde durch quantitative Realtime-PCR ermittelt und im Verhältnis zu dem *Housekeeping*-Gen GAPDH dargestellt. (Mittelwert \pm SD, $n=3$, * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$, *** = $p<0.005$)

3.3.3 Sgp130Fc vermindert die wachstumsschädigende Wirkung von hIL-6 und Tunicamycin

Nachdem gezeigt wurde, dass *Trans-Signaling* und Tunicamycin einen synergistischen Einfluss auf die Induktion der UPR haben und antiproliferative Effekte im intestinalen Epithel vermitteln, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob dieser Effekt durch sgp130Fc antagonisiert werden kann. Dazu wurde erneut *Classic* bzw. *Trans-Signaling* repetitiv in drei Zyklen à 24 Stunden induziert und nach Setzen der Läsion Tunicamycin appliziert (Abb. 3.17A). Zusätzlich wurden die IL-6-Signalwege jedoch je-

weils 4 Stunden vor Induktion durch die Inhibitoren Tocilizumab oder sgp130Fc blockiert. Es wurde sichtbar, dass sgp130Fc die schädigende Wirkung einer gleichzeitigen chemischen Induktion von ER-Stress und repetitiver Vorstimulation mit hIL-6 deutlich abschwächen, jedoch nicht vollständig verhindern konnte (Abb. 3.17B). Die hemmende Wirkung von Tocilizumab hingegen konnte den wachstums mindernden Effekt, den IL-6 zusammen mit Tunicamycin hervorrief, nicht abschwächen.

A)



B)

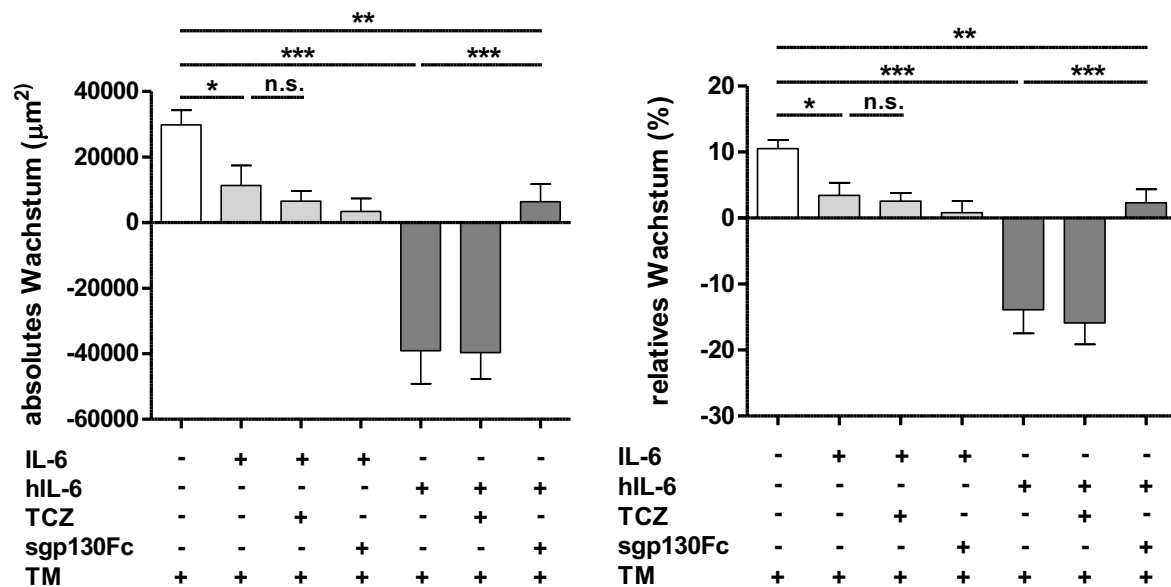


Abbildung 3.17: Epitheliale Wundheilung nach Hemmung der IL-6-Signalwege und ER-Stress

A) Stimulationsschema: HT-29 Zellen wurden in drei Zyklen je 24 Stunden mit PBS, IL-6 [100 ng/ml] oder hIL-6 [100 ng/ml] stimuliert. Jeweils 4 Stunden zuvor wurde *Classic* bzw. *Trans-Signaling* mittels Tocilizumab [1000 ng/ml] oder sgp130Fc [1000 ng/ml] gehemmt. Vor dem dritten Stimulationszyklus wurden pro *well* 3 Wunden gesetzt und zusätzlich chemischer ER-Stress durch TM [1 $\mu\text{g/ml}$] erzeugt. In **B)** sind das absolute und relative Wachstum 24 Stunden nach der Verwundung dargestellt. (Mittelwert \pm SD, n=18, * = p<0.05; ** = p<0.01, *** = p<0.005, n.s.=nicht signifikant)

4 Besprechung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Zytokins IL-6 in Bezug auf die zelluläre Wundheilung im intestinalen Epithel zu charakterisieren. Dabei soll überprüft werden, ob die bekannten Signalwege *Classic Signaling* und *Trans-Signaling* hier unterschiedliche Effekte hervorrufen, die als therapeutische Angriffsziele in der Entzündungs- und Tumormedizin genutzt werden können. Insbesondere soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob die systemische pharmakologische Blockade von IL-6 *Classic* oder *Trans-Signaling* einen negativen Einfluss auf die intestinale Regeneration hat und damit mögliche unerwünschte Nebenwirkungen in der intestinalen Mukosa entstehen könnten. Zu diesem Zweck wurden Wundheilungsversuche in humanen Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt und das Wachstumsverhalten der Karzinomzellen nach Aktivierung oder Hemmung des jeweiligen Signalweges studiert.

4.1 *Classic* und *Trans-Signaling* in humanen Kolonkarzinomzelllinien

4.1.1 Humane Kolonkarzinomzelllinien sind durch den klassischen IL-6-Weg aktivierbar

Im Western Blot wurde beobachtet, dass die beiden Zytokine IL-6 und hIL-6 die Phosphorylierung von STAT3 induzierten. Dieser Effekt war in beiden Fällen sowohl dosis- als auch zeitabhängig und selbst nach langen Zeitspannen von 36 bzw. 72 Stunden noch sichtbar. Damit IL-6 eine Signaltransduktion über *Classic Signaling* vermitteln kann, ist eine Expression des mIL-6R notwendig. Für *Trans-Signaling* hingegen wird die lösliche Form des IL-6R benötigt. Während das Designer-Protein hIL-6 durch seine vorgeformte kovalente Bindung von IL-6 und sIL-6R ausschließlich *Trans-Signaling* induzieren kann, wäre es prinzipiell denkbar, dass IL-6 in den Zellversuchen die Aktivierung von STAT3 sowohl über *Classic* als auch über *Trans-Signaling* bewirkt. Der sIL-6R wird durch Proteolyse des mIL-6R oder durch alternatives Splicing gebildet [95]. Die dafür notwendigen proteolytischen Enzyme aus der ADAM-Familie werden auf der Oberfläche von Immunzellen wie zum Beispiel Makrophagen exprimiert [149, 151]. Da die Zellkulturen, die für die Versuche verwendet wurden, ausschließlich Epithelzellen und keine Immunzellen enthalten, findet auch keine Bildung des sIL-6R mittels *Shed-*

ding statt. Eine Signaltransduktion kann IL-6 folglich nur über den klassischen Signalweg vermitteln. Die zu beobachtende STAT3-Aktivierung nach Applikation von IL-6 verdeutlicht demnach, dass alle vier untersuchten Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, LoVo, SW480 und HCT-116) den mL-6R exprimieren, wie es nur von wenig anderen Zellpopulationen beschrieben wurde [152]. Da eine STAT3-Aktivierung gleichermaßen IL-6- wie hIL-6-abhängig erfolgte, kann daraus abgeleitet werden, dass zumindest in diesen Karzinomzellen *Classic Signaling* parallel neben *Trans-Signaling* existiert. Inwiefern maligne transformierte Karzinomzellen ein im Vergleich zu physiologischen Epithelzellen verändertes Expressionsmuster von Zytokinrezeptoren besitzen, um auf diese Weise über Wachstumsfaktoren Signale für verstärkte Zellteilung, Wachstum und Überleben zu erhalten, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden [153]. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass hIL-6 spezifisch *Trans-Signaling* induziert und IL-6 ohne den sIL-6R nur *Classic Signaling* aktiviert, kann mithilfe von Zellkulturexperimenten die spezifische Rolle der beiden Wege getrennt voneinander betrachtet werden.

4.1.2 Epitheliale Wundheilung wird nur über *Trans-Signaling* vermittelt

Die Aktivierung von *Trans-Signaling* beschleunigte dosisabhängig den Zusammenschluss der Wunde im Regenerationsversuch. *Classic Signaling* hingegen veränderte das Wachstum nicht, auch wenn sehr hohe und unphysiologische Serumkonzentrationen verwendet wurden. *Classic Signaling* wurde in anderen Gewebetypen wie in der Niere, der Leber und dem Pankreas sowie in Kornealzellen als derjenige Signalweg identifiziert, über den IL-6 regenerative Effekte vermittelt, während *Trans-Signaling* dort vorwiegend entzündungsfördernde Eigenschaften zeigt [86, 104, 107, 135, 154]. Aus diesem Grund wurde auch für das intestinale Epithel eine proliferative und insbesondere regenerative Wirkung von *Classic Signaling* vermutet. Die hier durchgeführten Versuche konnten diese Hypothese nicht stützen. Es zeigte sich keinerlei Einfluss von *Classic Signaling* auf die intestinale Wundheilung. Ebenso unerwartet zeigten sich auf der anderen Seite regenerative Eigenschaften von *Trans-Signaling*. Um diese gegenteilige Wirkung zu erklären, wurde in der Literatur nach proliferativen Eigenschaften von *Trans-Signaling* gesucht. Wie in der Einleitung dargestellt, besitzt IL-6 einen Einfluss auf die Entstehung von epithelialen Tumoren [103]. Grivennikov et al. zeigten im Tierversuch mit einem AOM-DSS-Modell, dass IL-6 das Auftreten von Kolonkarzinomen bei Mäusen mit vorangegangener Darmentzündung begünstigt und somit eine

wichtige Verbindung zwischen Darmentzündung und der Entstehung von Darmtumoren herstellt [89]. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass diese karzinogenen Effekte insbesondere über *Trans-Signaling* und nicht über *Classic Signaling* vermittelt werden und eine Abhängigkeit vom IL-6-Korezeptor gp130 und von STAT3 besteht [103]. *Trans-Signaling* verstärkt u.a. die Proliferation von Epithelzellen, indem es antiapoptotische Faktoren wie bcl-2 und bcl-xl aktiviert und damit den natürlichen Zelltod verhindert und gleichzeitig die Zellmitose initiiert [103]. Auf eine ähnliche Weise scheint es im Wundheilungsversuch über proliferative Mediatoren die Regeneration positiv zu beeinflussen. Jedoch sollte beachtet werden, dass es sich bei der Dosis von IL-6 und hIL-6 (je 100 ng/ml), die für die Wundheilungsversuche verwendet wurden, nicht um physiologische Serumkonzentrationen handelt. Selbst im entzündeten Zustand erhöht sich die Konzentration von IL-6 maximal auf etwa 10 ng/ml, wohingegen die Konzentration des sIL-6R auf Werte von bis zu 1000 ng/ml ansteigen kann [87, 88]. Für *Trans-Signaling* muss aus beiden Komponenten der IL-6/sIL-6R-Komplex aus je einem Molekül IL-6 und sIL-6 gebildet werden. Die prinzipiell niedrigere Konzentration von freiem IL-6 ist hierfür der limitierende Faktor. Garbers et al. haben berechnet, dass, selbst wenn die Konzentration von freiem IL-6 auf den 10-fachen Wert des sIL-6R ansteigen würde, nur etwa $\frac{3}{4}$ der IL-6-Moleküle einen Komplex mit dem sIL-6R eingehen [88]. Im physiologischen Kontext ist diese Rate deutlich geringer. Hinzukommt, dass synthetisch hergestelltes hIL-6 ein vielfach stärkeres Potenzial besitzt, gp130 zu aktivieren als physiologisch geformte IL-6/sIL-6R-Komplexe [155]. Aus diesem Berechnungsbeispiel muss der Schluss gezogen werden, dass eine Konzentration von 100 ng/ml hIL-6, wie sie im Wundheilungsversuch verwendet wurde, die (patho-) physiologische Bildung des IL-6/sIL-6R im lebenden Organismus nur bedingt nachbilden kann.

4.1.3 *Trans-Signaling* beeinflusst die Migration und Proliferation

In der Analyse der Wachstumskurve wurde deutlich, dass das stärkste Zellwachstum unabhängig vom Stimulationsprodukt direkt nach der Wundinduktion erfolgte. Je länger die Inkubation andauerte, desto geringer war das Wachstum pro Zeit. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus ist der Verbrauch von Nahrungsfaktoren im Nährmedium. Desweiteren verhindern Epithelzellen, die räumlich nahe beieinander liegen, eine überschießende Proliferation über sogenannte Kontaktinhibition, indem sie wachstumshemmende Signale ausschütten [156]. An dieser Stelle stellte sich die Frage, ob das Zusammenwachsen der Wunde durch Migration von randständigen

Epithelzellen oder durch Proliferation zustande kam und inwiefern diese Prozesse von IL-6-Signalwegen beeinflusst wurden. In der Einleitung wurde dargestellt, dass die Rekonstruktion der Darmschleimhaut aus drei Phasen besteht: der initialen epithelialen Restitutionsphase, bei der die Wundfläche mechanisch durch Migration von benachbarten Epithelzellen bedeckt wird, und den sich anschließenden Phasen von Proliferation und Ausdifferenzierung [3]. Für den ersten Schritt der Wundheilung ist es notwendig, dass Epithelzellen vorübergehend ihren Phänotyp verändern und mesenchymale Zellstrukturen annehmen [157]. Nur so können sie sich aus ihrem Zellverband lösen und zur Wundfläche migrieren. Dieser Prozess wird *epitheliale-zu-mesenchymale-Transition* (EMT) genannt und stellt neben seiner Bedeutung für die Wundheilung eine wichtige Voraussetzung für Karzinomzellen dar, Metastasen zu bilden [153]. Sie bilden Tochtergeschwülste, indem sie in anderes Körpergebiet migrieren und dort die Retransition zu epithelialen Zellen durchlaufen [153]. In der Literatur wurde beschrieben, dass IL-6 nicht nur Proliferation, sondern auch Motilität von Epithelzellen beeinflusst [158]. Über eine IL-6R-abhängige STAT3-Aktivierung vermittelt es eine EMT und trägt zur Entstehung von Kolonkarzinomen bei [159]. Auch in den HT-29-Zellen wurde die Expression von EMT-Markergenen nach Induktion von *Classic* und *Trans-Signaling* überprüft. Ausschließlich nach Applikation von hIL-6 wurde eine verminderte Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und eine verstärkte Expression des mesenchymalen Markergens SNAIL ausgelöst. Diese Beobachtung legt nahe, dass IL-6 insbesondere über *Trans-Signaling* sowohl die Migration als auch die Proliferation von Epithelzellen beeinflusst und dadurch zu einem beschleunigten Wachstum im Wundheilungsversuch führt. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für Wundheilung dar, andererseits könnte es die Entstehung von Tumoren begünstigen. Der erste schnelle Anstieg der Wundheilung mag durch eine rasche Mobilisierung von Zellen an den Wundrändern zustande kommen, im Weiteren kommt es zu einem Anstieg der Zellproliferation. In Folgeversuchen wäre es möglich, mit weiteren Methoden zwischen Migration und Proliferation zu unterscheiden: Mit dem sogenannten *MTS* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)-Assay ist es möglich, mithilfe von photometrischen Verfahren die Zellaktivität und Proliferationsrate zu bestimmen [160]. Der sogenannte *BrdU* (5-bromo-2'-deoxyuridine)-Assay detektiert die Inkorporation von BrdU, einer synthetisch hergestellten bromhaltigen Base, die während der Zellteilung anstelle von Thymidin in den DNA-

Strang eingebaut wird, und lässt auf diese Weise ebenfalls einen Rückschluss auf Proliferationsvorgänge zu [161].

4.1.4 Biologische Effekte der IL-6-Signalwege können spezifisch gehemmt werden

Eine Hemmung von beiden IL-6-Signalwegen durch Tocilizumab bzw. sgp130Fc ohne vorherige Induktion von *Classic* oder *Trans-Signaling* war für Kolonkarzinomzellen nicht toxisch. Selbst in sehr hohen Serumkonzentrationen hatte eine IL-6-Inhibitor keine negative Auswirkung auf die Migration/Proliferation im Wundheilungsversuch, während der Kontrollantikörper Infliximab diese leicht verminderte. In den untersuchten Karzinomzelllinien scheint endogen vermittelte Wundheilung demnach nicht durch eine autokrine Sekretion von IL-6-Signalweg-Elementen initiiert zu werden. Sowohl STAT3-Phosphorylierung als auch die Regeneration der Wundfläche nach Induktion von *Trans-Signaling* konnten mit monoklonalen Antikörpern aufgehoben werden. Der IL-6R-Antikörper Tocilizumab verminderte konzentrationsabhängig die IL-6 induzierte STAT3-Phosphorylierung. Auf die Wirkung von hIL-6 hatte es keinen Einfluss. Obwohl in der Literatur beschrieben wird, dass Tocilizumab auch *Trans-Signaling* inhibiert, da es die IL-6-Bindungsstelle beider IL-6-Rezeptoren erkennt und besetzt, kam dieser Effekt in-vitro nicht zu tragen [162]. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei dem Designerprotein um eine präformierte, stabile Bindung aus IL-6 und dem sIL-6R handelt, die nicht wieder in ihre Einzelbausteine zerfällt [99]. Tocilizumab verhindert die initiale Bildung dieses Komplexes, während es einen bereits präformierten Komplex wie hIL-6 nicht wieder lösen kann [88]. Das Fusionsprotein sgp130Fc verhinderte, wie es auch für das physiologisch vorkommende sgp130 beschrieben ist, dass eine STAT3-Aktivierung via *Trans-Signaling* stattfand, wohingegen *Classic Signaling* nicht beeinflusst wurde. Die hemmende Wirkung von sgp130Fc basiert auf einer kompetitiven Hemmung des IL-6/sIL-6R-Komplexes. Zu freiem IL-6 oder dem mIL-6R besitzt es keine Affinität [134]. Auch die fehlende Hemmbarkeit durch sgp130Fc bestätigt die Annahme, dass IL-6 in der Zellkultur tatsächlich nur den klassischen Signalweg aktiviert. Im Wundheilungsversuch und im Western Blot wurde deutlich, dass *Trans-Signaling* spezifisch durch sgp130Fc gehemmt wird und die IL-6-Antwort damit selektiv moduliert werden kann. Jedoch deuten die Ergebnisse auch darauf hin, dass zeitgleich mit der Hemmung des IL-6/sIL-6R-Komplexes ebenfalls die regenerative

Wirkung von IL-6 unterbunden wird. Anders als initial vermutet, führt die selektive Blockade von *Trans-Signaling* somit zu einer Hemmung der IL-6 induzierten Wundheilung in Kolonkarzinomzellen.

4.1.5 *Classic* und *Trans-Signaling* aktivieren den Jak/STAT-Signalweg

Es wurde gezeigt, dass STAT3 sowohl durch *Classic* als auch durch *Trans-Signaling* aktiviert werden kann. IL-6 und hIL-6 besitzen demnach das gleiche Potenzial, diesen wachstumsfördernden Signalweg zu induzieren [163]. Zusätzlich bewirkten die proinflammatorischen Zytokine IL-11 und IL-22 eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT3. Nur hIL-6 und IL-22 beeinflussten jedoch die Regeneration der Epithelzellen im Wundheilungsmodell und führten zu einer verstärkten Migration/Proliferation. Im Folgenden soll diskutiert werden, inwieweit die Aktivierung von STAT3 dafür verantwortlich ist, dass hIL-6, aber nicht IL-6 eine epitheliale Regeneration in HT-29-Zellen induziert. Um die im Zellversuch beobachtete Inkongruenz zwischen STAT3-aktivierender Wirkung und Induktion von epithelialer Wundheilung zu erklären, sollen zwei mögliche Ansätze gegenübergestellt werden.

4.1.5.1 Hypothese 1: *Trans-Signaling* aktiviert STAT3 stärker als *Classic Signaling*

Zum einen ist es möglich, dass die proliferativen Effekte vorwiegend über STAT3 vermittelt werden und umso ausgeprägter sind, je mehr STAT3-Moleküle aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren eine Expression von proliferativen Genen regulieren. Für diese Hypothese würde sprechen, dass hIL-6 und IL-22 deutlich höhere pSTAT3-Level erzeugten als IL-6 und IL-11. Hohe pSTAT3-Level im Western Blot korrelierten wiederum mit einer höheren Wachstumsrate im Wundheilungsversuch. IL-6 und IL-11 hingegen induzierten kaum STAT3-Phosphorylierung und hatten keinen Einfluss auf die Regeneration der Wundfläche. Jedoch konnte in keinem weiterführenden Versuch mit Sicherheit gezeigt werden, dass eine pharmakologische Hemmung von STAT3 die proliferative Wirkung von *Trans-Signaling* aufheben konnte und zu einem Rückgang der Wundheilung führte. Im Wundheilungsversuch, in dem ein handelsüblicher STAT3-Inhibitor verwendet wurde, zeigten sich diskrepante Ergebnisse bei der Betrachtung von absolutem und relativem Wachstum. In absoluten Werten besaß STAT3-Inhibitor keinen Einfluss auf die Regeneration der Wundfläche, während die Analyse des rela-

tiven Wachstums darauf hindeutete, dass eine STAT3-Inhibition das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling* tatsächlich abschwächen kann. Diese Aussage ist jedoch aus dem folgenden Grund nicht sicher zu verwerten: Prinzipiell scheint das absolute Wachstum im Wundheilungsmodell eine höhere Aussagekraft zu besitzen, da das relative Wachstum stärker vom Ausmaß der ursprünglichen Wundfläche abhängt. Bei besonders hohen Varianzen in der Wundbreite sollte das absolute Wachstum demnach bevorzugt betrachtet werden, was in diesem konkreten Fall auf eine untergeordnete Rolle von STAT3 hinweisen könnte. Auf der anderen Seite konnte nicht bewiesen werden, dass der STAT3-Inhibitor eine vollständige biologische Hemmung von STAT3 erzielte. Im Western Blot, der die Wirksamkeit der pharmakologischen Blockade überprüfen sollte, zeigte sich die pSTAT3-Bande nach Induktion von *Classic* bzw. *Trans-Signaling* trotz Addition des Inhibitors unverändert kräftig. Der Kontroll-Inhibitor sgp130Fc hingegen verhinderte nicht nur, dass über *Trans-Signaling* STAT3 aktiviert wurde, sondern verminderte auch den wachstumsfördernden Effekt von hIL-6. Damit diene es als prinzipieller Beweis dafür, dass das regenerative Potenzial von *Trans-Signaling* im Wundheilungsmodell pharmakologisch beeinflusst werden kann.

Ursächlich für die fehlende Wirkung der STAT3-Inhibition mag eine zu niedrig gewählte Konzentration des Inhibitors sein. In anderen Studien wurden Zellversuche mit bis zu 10-fach höherer Serumkonzentration des gleichen STAT3-Inhibitors durchgeführt [164, 165]. Zudem ist es möglich, dass der STAT3-Inhibitor weniger die STAT3-Phosphorylierung als die Translokation von bereits phosphoryliertem STAT3 verhindert und somit seine biologische Aktivität trotz kräftiger Bande im Western Blot gehemmt wird. Ein Folgeversuch könnte den Einfluss von STAT3 auf das Regenerationspotenzial von *Trans-Signaling* mittels siRNA näher untersuchen. Dass eine Transfektion in HT-29-Zellen möglich ist, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen getestet. Ebenso wurde beschrieben, dass ein Wundheilungsexperiment in transfizierten Kolonkarzinomzellen durchführbar ist [166, 167]. In solchen, genetisch veränderten Zellen wäre es möglich zu untersuchen, ob *Trans-Signaling* auch ohne STAT3-Aktivität epitheliale Regeneration induziert.

4.1.5.2 Hypothese 2: *Trans-Signaling* vermittelt Wundheilung über einen alternativen Signalweg

Der Hypothese der STAT3-abhängigen Regeneration soll die Hypothese einer STAT3-unabhängigen Proliferation/Migration gegenübergestellt werden. Diese besteht darin, dass *Trans-Signaling* einen alternativen wachstumsfördernden und STAT3-unabhängigen Signalweg aktiviert, auf den *Classic Signaling* keinen Einfluss besitzt. Bekannte IL-6-abhängige Signalwege sind beispielsweise die PI3K/AKT/mTOR-Kaskade sowie der p38-MAPK-Signalweg, die beide an zellproliferativen Prozessen wie Angiogenese, Zellwachstum und Zellüberleben sowie an der Entstehung von Kolonkarzinomen beteiligt sind [24, 168-170]. Auch die gp130/YAP/NOTCH-Signalachse sollte in zukünftigen Studien näher betrachtet werden. Taniguchi et al haben kürzlich beschrieben, dass Proliferation und Wundheilung in gp130-überexprimierenden intestinalen Epithelzellen von villin-gp130^{Act}-Mäusen durch eine STAT3-unabhängige YAP-Aktivierung vermittelt werden [171]. YAP ist ein Transkriptionsfaktor und steht normalerweise unter der Kontrolle des Hippo-Signalweges, der eine bedeutende Rolle in der Embryonalentwicklung und bei der Wachstumskontrolle von Organen einnimmt [172]. IL-6-Zytokine aktivieren ihren Korezeptor gp130, der wiederum die nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren STAT3 sowie YAP aktiviert, die beide proliferatives Potenzial besitzen [24, 173]. In Folge eines inflammatorischen Stimulus können aber beide Signalwege parallel ablaufen, ohne direkt aufeinander Einfluss zu nehmen [171]. Während ein konditionaler Knockout von gp130 im intestinalen Epithel bei Mäusen im DSS-Kolitis-Modell zur Ausbildung einer schweren Darmentzündung führt, sind villin-gp130^{Act}-Mäuse ebenso wie STAT3-überexprimierende Mäuse im Kolitisversuch geschützt [24, 171, 174]. Diese Studien demonstrieren eine proliferative Wirkung von gp130 und STAT3. Ob die gp130/YAP/NOTCH-Signalachse spezifisch durch *Trans-Signaling* und unabhängig von *Classic Signaling* induziert werden kann, ist jedoch bislang unbekannt. Es wurde beschrieben, dass YAP in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 durch Applikation von IL-6 aktiviert wird [171]. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde gezeigt, dass IL-6 in der Zellkultur ohne zusätzliche Addition von sIL-6R-Molekülen ausschließlich *Classic Signaling* aktiviert. Somit scheint die Hypothese, dass der gp130/YAP/NOTCH-Signalweg spezifisch über *Trans-Signaling* induziert wird, nicht zuzutreffen. Sollte IL-6 Wundheilung nicht ausschließlich über STAT3-, sondern ebenso über gp130-abhängige YAP/NOTCH-Aktivierung vermitteln, scheint dieser Vorgang demnach durch beide IL-6 Signalwege induzierbar zu sein. Folglich stellt sich

die Frage, ob *Classic* und *Trans-Signaling* prinzipiell die gleichen Signalwege aktivieren und dieselben Effekte vermitteln und lediglich das höhere biologische Potenzial von hIL-6 zu einer beschleunigten Wundheilung führt. Die Unterschiede der im Western Blot erhobenen Zeitkinetiken von IL-6 und hIL-6 sprechen dagegen, denn die Aktivierung von STAT3 war durch hIL-6 im Vergleich zu IL-6 deutlich prolongiert. Rake-
mann et al. haben beschrieben, dass hIL-6 ein etwa 10-fach stärkeres Potenzial besitzt als IL-6 [175]. Bestünde der einzige Unterschied zwischen IL-6 und hIL-6 in einem 10-fach höheren biologischem Potenzial, hätten sehr hohe Konzentrationen von IL-6 die Effekte von hIL-6 imitieren müssen. Jedoch hatte auch eine Konzentration von 1000 ng/ml IL-6 keinen regenerativen Effekt, während 100 ng/ml hIL-6 ausreichten, um signifikant die Wundheilung zu beeinflussen. Diese Beobachtung legt prinzipielle Unterschiede zwischen *Classic* und *Trans-Signaling* nahe.

4.2 *Classic* und *Trans-Signaling* in primären intestinalen Epithelzellen

4.2.1 *Classic Signaling* spielt eine untergeordnete Rolle im intestinalen Epithel

Nachdem in intestinalen Karzinomzellen gezeigt worden war, dass *Trans-Signaling*, aber nicht *Classic Signaling* einen Wachstumsreiz darstellt, wurden diesen Ergebnissen Versuche mit primären Enterozyten von IL-6R^{flox}- und IL-6R^{ΔIEC}-Mäusen gegenübergestellt. Hier zeigte sich nicht nur eine fehlende Aktivierung des klassischen Signalweges, gemessen an einer ausbleibenden STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6, sondern auch eine generell geringfügige Rolle des mIL-6R angesichts der vergleichbaren pSTAT3-Levels beider Genotypen. Auch in den intestinalen Organoiden besaß der Genotyp der IL-6R^{ΔIEC}-Mäuse keinen Einfluss auf die Größe, Konfiguration und Überlebensdauer der Miniaturdärme. Der mIL-6R scheint demnach für die physiologische Entstehung der neuen Darmkrypten nicht bedeutsam. Die fehlende Expression von STAT3-abhängigen Genen wie *Reg3b* und *Reg3g* nach IL-6-Stimulation bestätigt die fehlende Aktivierung des *Classic Signalings* in den Darmorganoiden. Zusammenfassend ergibt sich daraus die Schlussfolgerung, dass proliferative Signale in intestinalen Epithelzellen, die kein malignes Potenzial besitzen, weniger über *Classic* als vielmehr über *Trans-Signaling* vermittelt werden. Im physiologischen Zustand scheint eine Aktivierung des klassischen Signalweges auszubleiben.

4.2.2 Beide IL-6-Signalwege sind miteinander verzahnt

Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass der mIL-6R sehr wohl eine Rolle im intestinalen Epithel spielt, nämlich in der intestinalen Tumorentstehung [176]. Die biologische Aktivierung von STAT3 sowie die verstärkte Expression von STAT3-Genen in Karzinomzelllinien deutet ebenfalls darauf hin, dass der mIL-6R eine potenziell wachstumssteigernde Wirkung auf maligne Zellen besitzt, die jedoch im Regenerationsversuch nicht zu einem messbaren Einfluss auf die Wundheilung führte. Im Modell der akuten DSS-Kolitis sind IL-6R^{ΔIEC}-Mäuse ebenso wie Mäuse, die vollständig IL-6-defizient sind, nicht anfälliger für die Entwicklung einer Darmentzündung, sondern zeigen sogar eine tendenziell günstigere Reaktion auf den Inflammationsstimulus [86, 177]. Dieses Ergebnis verdeutlicht einerseits, angesichts der bestehenden Unterschiede zwischen den beiden Genotypen, dass der mIL-6R im intestinalen Epithel im Entzündungszustand eine Rolle besitzt. Desweiteren deutet es darauf hin, dass die proliferativen Effekte von IL-6 im intestinalen Epithel auch in-vivo weniger durch *Classic*, sondern vielmehr durch *Trans-Signaling* hervorgerufen werden, da die Hemmung von *Classic Signaling* nicht zu stärkerer Anfälligkeit gegenüber DSS führt, sondern sogar einen leichten Schutz bewirkt [177]. Es stellt sich jedoch weiterhin die Frage, worin genau die (patho-)physiologische Bedeutung des mIL-6R und von *Classic Signaling* im intestinalen Epithel bestehen. Yan et al. zeigten, dass ein inflammatorischer Auslöser wie zum Beispiel eine Listerieninfektion zu einem Verlust des mIL-6R auf der Zelloberfläche von Leukozyten führt und die Plasmakonzentration des sIL-6R proportional ansteigt [178]. Dieses Phänomen führten sie auf einen entzündungsgetriggerten Anstieg von *Sheddings* des mIL-6R durch ADAM17 zurück. Eine mögliche Funktion des mIL-6R besteht darin, dass er das mechanische Grundgerüst für die Bildung des sIL-6R bildet und die anschließende Initiierung von *Trans-Signaling* ermöglicht [95]. Wird der mIL-6R wie bei IL-6R^{ΔIEC}-Mäusen nicht auf der Oberfläche der Darmepithelzellen exprimiert, entfällt diese Ressource für die Bildung des sIL-6R und neben *Classic Signaling* wird somit auch *Trans-Signaling* beeinflusst. Sollten regenerative Eigenschaften von IL-6 ausschließlich über IL-6-*Trans-Signaling* vermittelt werden, sollte auch die Wundheilung umso geringer ausgeprägt sein, je weniger mIL-6 und folglich auch sIL-6 zur Verfügung stehen. Die IL-6R^{ΔIEC}-Tiere, deren Darmepithel kein mIL-6R trägt, aus dem der sIL-6R gebildet werden kann, zeigen jedoch keine geringere epitheliale Wundheilung in der DSS-Kolitis [177]. Neben intestinalen Epithelzellen exprimieren auch zirkulierende Immunzellen den mIL-6R, aus dem ebenfalls der sIL-6R mittels

Shedding gebildet werden kann [149]. Es steht also insbesondere in entzündetem Gewebe durch den Einstrom von Immunzellen eine weitere Ressource für die Bildung des sIL-6R zur Verfügung. Fehlende Unterschiede zwischen den beiden Genotypen in der DSS-Kolitis mögen darauf hindeuten, dass die Bedeutung des mIL-6R im Darmepithel als Ressource für die Bildung des sIL-6R im Vergleich zu Immunzellen geringfügig ist. Andererseits wäre es ebenfalls möglich, dass der neu gebildete sIL-6R Leukozyten anlockt, die wiederum eine Entzündungsreaktion verstärken. Es ist bekannt, dass Zytokine als Chemokine wirken können und auf diese Weise den Einstrom von Entzündungszellen verursachen [80]. Dieser Mechanismus könnte erklären, warum die IL-6R^{ΔIEC}-Tiere weniger starke Entzündungszeichen zeigen. Es wurde desweiteren beobachtet, dass IL-6R^{ΔIEC}-Mäuse in der experimentellen AOM-Karzinogenese nicht weniger Tumore entwickeln als ihre Artgenossen, sondern eine vergleichbare Reaktion zeigen wie IL-6R^{flox}-Mäuse [177]. Auch hier bestätigt sich nicht, dass der mIL-6R proliferative und damit in diesem Fall karzinogene Effekte vermittelt. Zusammengefasst unterstreichen diese Ergebnisse die Theorie, dass *Classic Signaling* im intestinalen Epithel eine untergeordnete Rolle spielt und dass sowohl entzündungsfördernde als auch regenerative und proliferative Effekte eher über *Trans-Signaling* ausgelöst werden.

4.3 Limitationen des regenerativen Einflusses von *Trans-Signaling*

Im Zellversuch mit humanen Kolonkarzinomzellen wurde deutlich, dass *Trans-Signaling* nicht in jedem Fall zu einer verstärkten Regeneration im Wundheilungsversuch führte. Im Folgenden soll diskutiert werden, unter welchen Bedingungen *Trans-Signaling* regenerative Effekte vermittelt und welche Limitationen sich zeigen.

4.3.1 *Trans-Signaling* induziert ER-Stress

Humane Kolonkarzinomzellen, die mit hIL-6 stimuliert wurden, zeigten eine leichte Aktivierung des ER-Stress-Markers sXBP1, während IL-6 diesen Effekt nicht auslöste. Bei sehr langer Stimulationsdauer und repetitiver Induktion von *Trans-Signaling* war die Genexpression von ATF4, GRP94 und des Quotienten aus sXBP1 und XBP erhöht und somit alle drei Zweige der *Unfolded Protein Response* aktiviert, wohingegen *Classic Signaling* auch hier keinen nachweisbaren ER-Stress erzeugte. Nur wenn eine ein-

malige Applikation von hIL-6 und 24-stündige Inkubation erfolgte, zeigte sich ein regenerativer Effekt. Bei wiederholten, langen Stimulationsspannen war kein Unterschied zur Negativkontrolle zu verzeichnen. Bei zusätzlicher chemischer Induktion von ER-Stress mittels Tunicamycin kam es zu einer stark erhöhten Expression von ER-Stress-Markern und zu einer eingeschränkten Wundheilung. Im korrespondierenden Versuch mit IL-6 waren ähnliche Tendenzen sichtbar, die Effekte aber sehr viel schwächer ausgeprägt. Es stellte sich die Frage, warum *Trans-Signaling* einerseits wundheilungsfördernd wirkt und auf der anderen Seite ER-Stress vermittelt, der bei Kumulation der Stressreize den Regenerationsprozess sogar verschlechtert.

4.3.2 ER-Stress beeinflusst die intestinale Wundheilung

Die kontinuierliche Anreicherung von ungefalteten Proteinen in der Zelle, erzeugt einen Stressreiz für das endoplasmatische Retikulum, welches kompensatorisch die UPR aktiviert [54]. Chronisch persistierender ER-Stress und das Versagen dieser Kompensationsmechanismen führen zu Apoptose und können im intestinalen Epithel zu schweren Barrieredefekten führen. [55]. Das ER nimmt somit eine wichtige Funktion für die Regulation von Zellüberleben und Zelltod ein und trägt somit entscheidend zur Zellhomöostase bei [54]. Starker ER-Stress führt zu einem Wachstumsstopp und vermindert die epitheliale Wundheilung, ein wichtiger Mechanismus in der Pathogenese von CED [71]. Aus diesem Grund erscheint es folgerichtig, dass das Wachstum in denjenigen Zellen vermindert war, in denen die ER-Stress-Marker stark exprimiert wurden. hIL-6 und in geringerem Ausmaß auch IL-6 wirkten synergetisch mit Tunicamycin und verstärkten den ER-Stress, was negativ mit der Regeneration korrelierte. Niederreiter et al. haben beschrieben, dass ein unterschwelliger ER-Stress positiv auf das Zellwachstum wirken kann [59]. Der genetische *Knockout* von XBP1 in Mäusen erzeugt ER-Stress in in-vitro- und in-vivo-Versuchen [59]. Da hier ein Zweig der UPR beschädigt ist, kann die Zelle nur noch eingeschränkt die Überlastung des ER durch die externen Stressoren kompensieren. Tierversuche haben gezeigt, dass dieser Mangel an XBP1 im intestinalen Epithel die Stammzellproliferation verstärkt [59]. Genetisch veränderte XBP1^{ΔIEC}-Mäuse zeichnen sich durch einen bereits unter Ruhebedingungen stark erhöhten ER-Stress aus. Sie weisen sowohl eine kompensatorisch erhöhte IRE1-Aktivität als auch einen Anstieg von pSTAT3 im Darmepithel auf, wodurch intestinale Epithelzellen zu Wachstum und Zellteilung angeregt werden [59]. Dieser Vor-

gang ist STAT3-abhängig und wird insbesondere auf eine fehlende Dephosphorylierung und damit Hemmung von pSTAT3 und weniger auf eine aktive Induktion der Kinase zurückgeführt. Eine einmalige Applikation von hIL-6 vermittelt ähnliche Effekte. Neben der Aktivierung der STAT3-Kinase verstärkt es die Expression von *gesplicedem* XBP1, dem Marker, der eine erhöhte IRE1-Aktivität widerspiegelt. Demnach löst es einerseits milden ER-Stress aus, andererseits triggert es die epitheliale Wundheilung. Diese Beobachtung steht mit den Ergebnissen von Niederreiter et al. im Einklang und deutet ebenfalls darauf hin, dass ein basales Level von ER-Stress nicht zwingend zu einem Proliferationsstopp führt, sondern möglicherweise sogar zur gesteigerten Wundheilung beitragen kann. Erst wenn eine Zelle so stark überlastet ist, dass alle Ressourcen erschöpft sind und die Anzahl der ungefalteten oder fehlerhaften Proteine einen Schwellenwert überschreitet, wird dadurch auch die epitheliale Wundheilung beeinträchtigt. Gibt es gleich mehrere Stressreize wie zum Beispiel die simultane Induktion von ER-Stress durch Tunicamycin und durch *Trans-Signaling*, wird die Wundheilung gehemmt und es kann sogar zu einer schädigenden Wirkung kommen. An diesem Punkt versagen vermutlich die Kompensationsmechanismen des ER, die die Zellhomöostase bislang aufrechterhalten haben, und die Zelle leitet die Apoptose ein [179]. Das ER wirkt also als eine Art Schalter, der den Übergang zwischen Proliferation und Zelltod vermittelt, und kann durch Zytokine wie hIL-6 in die eine oder die andere Richtung gelenkt werden [53]. Sgp130Fc kann, wenn es ebenfalls mehrfach appliziert wird, den Stressstimulus, den *Trans-Signaling* verursacht, abschwächen, jedoch nicht vollständig aufheben. Dies mag daran liegen, dass trotz der hohen Konzentration von sgp130Fc nicht alle hIL-6-Moleküle gehemmt wurden. Auffällig war, dass Tocilizumab nicht im gleichen Maße dazu fähig war, den synergistischen Effekt von IL-6 und Tunicamycin abzupuffern, möglicherweise, weil hier der Effekt insgesamt nicht so stark ausgeprägt war. Die Versuche deuten darauf hin, dass ein kurzzeitiger Stimulus von hIL-6, der über *Trans-Signaling* zu STAT3-Aktivierung führt, keinen Schaden für die Zelle verursacht und die Karzinomzellen in-vitro zum Wachstum und zur Wundheilung anregt. Dauerhafte Induktion von *Trans-Signaling* und Aktivierung von STAT3 scheinen jedoch insbesondere zusammen mit einem additionalen Stimulus nachteilige Effekte auf die Zellhomöostase zu haben und mögen zu der Entstehung und Aufrechterhaltung von andauerndem ER-Stress und chronischen Entzündungen beitragen. Die pathophysiologische Rolle von STAT3 bleibt hier weiterhin nicht ausreichend geklärt, da sowohl *Classic* als auch *Trans-Signaling* STAT3 aktivieren, aber wiederum nur hIL-

6 deutliche Effekte verursachte. 2018 wurde von Aden, Tran et al. beschrieben, dass das STAT3-aktivierende Zytokin IL-22 ebenfalls pro- wie antiinflammatorische Effekte vermitteln kann. Eine wichtige regulatorische Rolle hierbei spielen die *Unfolded Protein Response* sowie eine Induktion von Autophagie [180]. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhter ER-Stress, Defizite in Autophagiemechanismen und eine Induktion des IL-22-Signalweges synergistisch wirken und Nekroptose verursachen [180]. Ob ein ähnlicher Mechanismus auch auf die IL-6-Signalwege zutrifft, sollte in künftigen Experimenten untersucht werden.

Desweiteren sollten anschließende Untersuchungen unterscheiden, ob hIL-6 stärkere Effekte durch verstärkte STAT3-Aktivierung vermittelt oder ob hierfür ein anderer Signalweg entscheidend ist. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse wäre ein positiver Einfluss von sgp130Fc denkbar, da auf diese Weise starker ER-Stress und Zelluntergang verhindert würden. Auch an dieser Stelle ergibt sich kein Anhalt darauf, dass die ausschließliche Inhibition von *Classic Signaling* der vollständigen IL-6-Hemmung überlegen ist.

4.4 Fazit

Aus der vorliegenden Arbeit werden folgende Hauptaussagen abgeleitet:

4.4.1 Der regenerative Einfluss von *Trans-Signaling* im intestinalen Epithel ist kontextabhängig

Es wurde gezeigt, dass *Trans-Signaling* einerseits intestinale Epithelzellen zur Proliferation und Migration anregt. Dadurch vermittelt es im Wundheilungsversuch eine Steigerung der Regenerationsrate, im Falle einer fehlregulierten und anhaltenden Proliferation kann es zur Entstehung von Tumoren beitragen. Auf der anderen Seite verstärkt es chemisch induzierten Endoplasmatischen Retikulumsstress und kann auf diese Weise das Zellwachstum vermindern. Ob es regenerativ oder wachstumshemmend wirkt, ist u.a. davon abhängig, ob es einen additionalen Stressreiz gibt, der zusätzlich die Zellhomöostase negativ beeinflusst. Zudem heben lange und repetitive Induktionen von *Trans-Signaling* das regenerative Potenzial auf, das einmalige und kürzer andauernde Stimulation mit hIL-6 hervorruft. Die zusätzliche Induktion von ER-Stress führt sogar zum Zelluntergang. Der molekulare Mechanismus, über den *Trans-Signaling* Wachstum fördert oder unterdrückt, bleibt weiterhin unklar. Ein Einfluss der

Jak/STAT3-Signalkaskade auf diese Effekte ist angesichts vieler Studien wahrscheinlich, kann mit dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt oder ausgeschlossen werden. Auch alternative Signalwege sollten in zukünftigen Studien als Auslöser bedacht werden.

4.4.2 Sgp130Fc hemmt beide Wirkungsprofile von *Trans-Signaling*

Sowohl die Regeneration im Wundheilungsversuch als auch die zellschädigende Wirkung von hIL-6 im Zusammenhang mit ER-Stress wird durch den Antikörper sgp130Fc aufgehoben. Er ist somit in der Lage, die unterschiedlichen Eigenschaften von *Trans-Signaling* therapeutisch auszuschalten. Dass eine Behandlung mit sgp130Fc für Patienten mit CED im Allgemeinen vorteilhaft ist, kann daraus nicht geschlossen werden, da nicht gezeigt wird, ob im entzündeten Darm die regenerativen oder die entzündungsfördernden Eigenschaften von *Trans-Signaling* überwiegen. Da ein wichtiger Pathomechanismus von CED jedoch versagende Kompensationsmechanismen von chronischem ER-Stress ist, ist es wahrscheinlich, dass *Trans-Signaling* diesen bei Patienten mit CED verstärkt und damit zur Beschädigung der Epithelbarriere beiträgt. In diesem Fall würde sich ein Benefit von sgp130Fc ergeben.

4.4.3 *Classic Signaling* spielt gegenüber *Trans-Signaling* eine untergeordnete Rolle im intestinalen Epithel

Die Bindung von IL-6 an den mL-6R führte zwar in den Kolonkarzinomzellen zu einer STAT3-Aktivierung, jedoch ließ sich hierdurch kein oder nur ein sehr geringer biologischer Effekt im Wundheilungsversuch und in der Genexpression von ER-Stress-Markern beobachten. Dass *Classic Signaling* an der intestinalen Regeneration beteiligt ist oder der mL-6R eine bedeutende Funktion bei der Entstehung von CED ausübt, konnte somit nicht bestätigt werden. In murinen intestinalen Epithelzellen sowie in Dünndarmorganoiden von IL-6R^{ΔIEC}- und IL-6R^{flox}-Mäusen zeigte sich durch IL-6 keine Aktivierung der Jak/STAT3-Signalachse über *Classic Signaling*. In intestinalen Tumorzellen hingegen findet eine Signaltransduktion über den klassischen Signalweg statt. Wenn auch diese nicht in den Regenerationsprozess eingreift, deutet sie jedoch einen Einfluss von *Classic Signaling* auf maligne Zellen an. Zwar ist es schwierig, *Classic* und *Trans-Signaling* scharf voneinander zu trennen, da beide Signalwege miteinander in Verbindung stehen und der mL-6R für die Bildung des sIL-6R benötigt wird, jedoch scheint *Classic Signaling* im intestinalen Epithel eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Hypothese, dass eine selektive Hemmung von *Trans-Signaling* einer vollständigen

IL-6-Inhibition in Bezug auf die intestinale Wundheilung überlegen ist, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht stützen, da eine regenerative Wirkung von *Classic Signaling* nicht nachgewiesen werden konnte.

4.4.4 Aussagen über Reaktionsabläufe in-vivo sind nur begrenzt möglich

Es muss beachtet werden, dass die Konzentrationen von IL-6 und hIL-6, die in dieser Arbeit verwendet wurden, keine physiologischen sind und in-vivo selbst im Entzündungszustand die Plasmalevel von IL-6 und dem sIL-6R nicht derart ansteigen. Die in-vitro-Versuche wurden vornehmlich in Kolonkarzinomzelllinien durchgeführt, deren Rezeptorexpressionsmuster im Vergleich zu nativen Darmepithelzellen verändert ist, sodass es nicht möglich ist, daraus präzise Aussagen über Reaktionen in-vivo abzuleiten. Zusammen mit den erhobenen Daten in murinen Epithelzellen und Organoiden demonstrieren sie dennoch die Relevanz von IL-6-*Trans-Signaling* im intestinalen Epithel.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der beiden IL-6 Signalwege *Classic* und *Trans-Signaling* im intestinalen Epithel und ihr Einfluss auf die intestinale epitheliale Wundheilung untersucht.

Beide Wege können parallel in humanen Kolonkarzinomzelllinien induziert werden. Sowohl *Classic* als auch *Trans-Signaling* vermitteln dosis- und zeitabhängig eine STAT3-Phosphorylierung, jedoch hat nur *Trans-Signaling* einen positiven Einfluss auf die epitheliale Wundheilung. Eine IL-6 abhängige STAT3-Aktivierung lässt sich mittels handelsüblicher Antikörper gegen den IL-6R (Tocilizumab) und den IL-6/sIL-6R-Komplex (sgp130Fc) aufheben, wobei *Classic Signaling* spezifisch durch Tocilizumab und *Trans-Signaling* spezifisch durch sgp130Fc gehemmt wird. Auch der regenerative Effekt von *Trans-Signaling* kann mittels sgp130Fc inhibiert werden.

Trans-Signaling erzeugt im Gegensatz zu *Classic Signaling* milden ER-Stress in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29, aktiviert die *Unfolded Protein Response* und verstärkt chemisch induzierten ER-Stress. Repetitive Induktion von *Trans-Signaling* führt dazu, dass sein regeneratives Potenzial aufgehoben wird. Bei gleichzeitiger chemischer Induktion von ER-Stress entsteht sogar eine zellschädigende Wirkung. Auch dieser Effekt wird durch sgp130Fc abgeschwächt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Trans-Signaling* im intestinalen Epithel sowohl regenerative als auch zellschädigende Effekte vermitteln kann. Der Einfluss auf die epitheliale Wundheilung ist u.a. abhängig von der Dauer des IL-6-Signals, endogenen Konditionen wie der ER-Funktion und der Integrität der Zellhomöostase sowie von zusätzlichen externen Stimuli.

In Versuchen mit konditionalen *Knockout*-Mäusen, die keinen mIL-6R im intestinalen Epithel exprimieren, zeigt sich eine STAT3-Aktivierung bei murinen intestinalen Epithelzellen und Dünndarm-Organoiden ausschließlich über *Trans-Signaling* und nicht über *Classic Signaling* aktivierbar. Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine IL-6-Antwort im intestinalen Epithel im Wesentlichen über *Trans-Signaling* erfolgt, während *Classic Signaling* und der mIL-6R hier eine untergeordnete Rolle spielen.

6 Literaturverzeichnis

1. Pastorelli, L., et al., *Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 280.
2. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
3. Sturm, A. and A.U. Dignass, *Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 348-53.
4. Maldonado-Contreras, A.L. and B.A. McCormick, *Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 5-12.
5. Kelly, C.J., et al., *Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(5): p. 662-71.
6. Michielan, A. and R. D'Inca, *Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 628157.
7. Dignass, A.U. and A. Sturm, *Peptide growth factors in the intestine*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. **13**(7): p. 763-70.
8. Podolsky, D.K., *Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 1): p. G179-86.
9. Kuhn, K.A., et al., *IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114195.
10. Brand, S., et al., *IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G827-38.
11. Shi, H., M. Sujeebun, and Z. Song, *Psoriasis as a model of exaggerated, not dysregulated, wound healing presents potential therapeutic targets for enhanced tissue repair integrity and diminished scaling*. Surgery, 2014. **156**(1): p. 15-9.
12. Francescone, R., V. Hou, and S.I. Grivennikov, *Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(2): p. 409-18.

13. Molodecky, N.A., et al., *Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review*. Gastroenterology, 2012. **142**(1): p. 46-54 e42; quiz e30.
14. Kelsen, J. and R.N. Baldassano, *Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14 Suppl 2**: p. S9-11.
15. Baumgart, D.C. and S.R. Carding, *Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology*. Lancet, 2007. **369**(9573): p. 1627-40.
16. Danese, S., et al., *Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(46): p. 7227-36.
17. Vavricka, S.R., et al., *Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(1): p. 110-9.
18. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
19. Friedman, S., et al., *Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis: results of a surveillance program spanning 25 years*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. **6**(9): p. 993-8; quiz 953-4.
20. Shorter, R.G., K.A. Huizenga, and R.J. Spencer, *A working hypothesis for the etiology and pathogenesis of nonspecific inflammatory bowel disease*. Am J Dig Dis, 1972. **17**(11): p. 1024-32.
21. Joossens, M., et al., *Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives*. Gut, 2011. **60**(5): p. 631-7.
22. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, *Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 549-59.
23. Nakazawa, A., et al., *The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells*. Gastroenterology, 2004. **126**(5): p. 1347-57.
24. Bollrath, J., et al., *gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 91-102.
25. Umehara, Y., et al., *Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis*. Hepatogastroenterology, 2006. **53**(72): p. 879-82.

26. Eastaff-Leung, N., et al., *Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease*. J Clin Immunol, 2010. **30**(1): p. 80-9.
27. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 1081-90.
28. Schreiber, S., et al., *Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 376-88.
29. Nguyen, G.C., et al., *Inflammatory bowel disease characteristics among African Americans, Hispanics, and non-Hispanic Whites: characterization of a large North American cohort*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(5): p. 1012-23.
30. Tysk, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking*. Gut, 1988. **29**(7): p. 990-6.
31. Doecke, J.D., et al., *Genetic susceptibility in IBD: overlap between ulcerative colitis and Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(2): p. 240-5.
32. Franke, A., et al., *Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(12): p. 1118-25.
33. Anderson, C.A., et al., *Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47*. Nat Genet, 2011. **43**(3): p. 246-52.
34. Cocchi, E., et al., *A model to investigate SNPs' interaction in GWAS studies*. J Neural Transm (Vienna), 2015. **122**(1): p. 145-53.
35. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
36. Sabbah, A., et al., *Activation of innate immune antiviral responses by Nod2*. Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
37. Koloski, N.A., L. Bret, and G. Radford-Smith, *Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(2): p. 165-73.

38. Klement, E., et al., *Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: a population-based study*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(7): p. 1775-82.
39. Ye, Y., et al., *The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(12): p. 22529-42.
40. Ott, C., et al., *Smoking increases the risk of extraintestinal manifestations in Crohn's disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(34): p. 12269-76.
41. Yadav, P., et al., *Genetic Factors Interact With Tobacco Smoke to Modify Risk for Inflammatory Bowel Disease in Humans and Mice*. Gastroenterology, 2017. **153**(2): p. 550-565.
42. McGovern, D.P., et al., *Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci*. Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 332-7.
43. Sakamoto, N., et al., *Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(2): p. 154-63.
44. Amre, D.K., et al., *Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(9): p. 2016-25.
45. Legaki, E. and M. Gazouli, *Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases*. World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2016. **7**(1): p. 112-25.
46. Koutroubakis, I.E., I.G. Vlachonikolis, and E.A. Kouroumalis, *Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(4): p. 277-86.
47. Frolkis, A., et al., *Environment and the inflammatory bowel diseases*. Can J Gastroenterol, 2013. **27**(3): p. e18-24.
48. Soderholm, J.D., et al., *Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease*. Gut, 2002. **50**(3): p. 307-13.
49. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.

50. Adolph, T.E., et al., *Endoplasmic reticulum stress and inflammation*. Dig Dis, 2012. **30**(4): p. 341-6.
51. Pereira, E.R., et al., *Endoplasmic reticulum (ER) stress and hypoxia response pathways interact to potentiate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) transcriptional activity on targets like vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Biol Chem, 2014. **289**(6): p. 3352-64.
52. Krebs, J., L.B. Agellon, and M. Michalak, *Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **460**(1): p. 114-21.
53. Kaser, A., et al., *The unfolded protein response and its role in intestinal homeostasis and inflammation*. Exp Cell Res, 2011. **317**(19): p. 2772-9.
54. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
55. Kaser, A., T.E. Adolph, and R.S. Blumberg, *The unfolded protein response and gastrointestinal disease*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(3): p. 307-19.
56. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
57. Kaser, A., et al., *XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease*. Cell, 2008. **134**(5): p. 743-56.
58. McCole, D.F., *IBD candidate genes and intestinal barrier regulation*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(10): p. 1829-49.
59. Niederreiter, L., et al., *ER stress transcription factor Xbp1 suppresses intestinal tumorigenesis and directs intestinal stem cells*. J Exp Med, 2013. **210**(10): p. 2041-56.
60. Schurmann, C., et al., *Deregulated unfolded protein response in chronic wounds of diabetic ob/ob mice: a potential connection to inflammatory and angiogenic disorders in diabetes-impaired wound healing*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**(1): p. 195-200.
61. Cubillos-Ruiz, J.R., et al., *ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis*. Cell, 2015. **161**(7): p. 1527-38.

62. Karam, C., et al., *Trends in Cardiovascular Disease Risk Factor Prevalence and Estimated 10-Year Cardiovascular Risk Scores in a Large Untreated French Urban Population: The CARVAR 92 Study*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0124817.
63. Neurath, M.F. and S.P. Travis, *Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review*. Gut, 2012. **61**(11): p. 1619-35.
64. Taupin, D. and D.K. Podolsky, *Trefoil factors: initiators of mucosal healing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(9): p. 721-32.
65. Okamoto, R. and M. Watanabe, *Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia*. J Gastroenterol, 2004. **39**(1): p. 1-6.
66. Buffin-Meyer, B., et al., *EGF receptor transactivation and PI3-kinase mediate stimulation of ERK by alpha(2A)-adrenoreceptor in intestinal epithelial cells: a role in wound healing*. Eur J Pharmacol, 2007. **574**(2-3): p. 85-93.
67. Dignass, A., et al., *Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor beta-independent pathway*. J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 376-83.
68. Krishnan, K., B. Arnone, and A. Buchman, *Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 410-22.
69. Allez, M., et al., *Long term outcome of patients with active Crohn's disease exhibiting extensive and deep ulcerations at colonoscopy*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(4): p. 947-53.
70. Kobayashi, T., et al., *Rapid endoscopic improvement is important for 1-year avoidance of colectomy but not for the long-term prognosis in cyclosporine A treatment for ulcerative colitis*. J Gastroenterol, 2010. **45**(11): p. 1129-37.
71. Luo, K. and S.S. Cao, *Endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cell function and inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Res Pract, 2015. **2015**: p. 328791.
72. Paoluzi, O.A., et al., *Azathioprine or methotrexate in the treatment of patients with steroid-dependent or steroid-resistant ulcerative colitis: results of an open-label study on efficacy and tolerability in inducing and maintaining remission*. Aliment Pharmacol Ther, 2002. **16**(10): p. 1751-9.

73. Ezri, J., P. Marques-Vidal, and A. Nydegger, *Impact of disease and treatments on growth and puberty of pediatric patients with inflammatory bowel disease*. Digestion, 2012. **85**(4): p. 308-19.
74. Curkovic, I., M. Egbring, and G.A. Kullak-Ublick, *Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates*. Dig Dis, 2013. **31**(3-4): p. 368-73.
75. Valentino, P.L., et al., *Hepatotoxicity caused by methotrexate therapy in children with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(1): p. 47-59.
76. de Mattos, B.R., et al., *Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 493012.
77. Suenart, P., et al., *Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(8): p. 2000-4.
78. Ungar, B., et al., *Optimizing Anti-TNF-alpha Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2016. **14**(4): p. 550-557 e2.
79. Argollo, M., et al., *Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease*. J Autoimmun, 2017. **85**: p. 103-116.
80. Caneparo, V., et al., *Distinct Anti-IFI16 and Anti-GP2 Antibodies in Inflammatory Bowel Disease and Their Variation with Infliximab Therapy*. Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(12): p. 2977-2987.
81. Weisshof, R., et al., *Anti-infliximab Antibodies with Neutralizing Capacity in Patients with Inflammatory Bowel Disease: Distinct Clinical Implications Revealed by a Novel Assay*. Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(7): p. 1655-61.
82. Takac, B., et al., *Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Coll Antropol, 2014. **38**(2): p. 659-64.
83. Sommer, J., et al., *Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis*. Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 651-60.

84. Mudter, J. and M.F. Neurath, *Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 1016-23.
85. Taga, T. and T. Kishimoto, *Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 797-819.
86. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
87. Rose-John, S., *IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(9): p. 1237-47.
88. Garbers, C., et al., *Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor*. J Biol Chem, 2011. **286**(50): p. 42959-70.
89. Grivennikov, S., et al., *IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer*. Cancer Cell, 2009. **15**(2): p. 103-13.
90. Gabay, C., et al., *Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes*. Eur J Immunol, 1995. **25**(8): p. 2378-83.
91. Schmitz, J., et al., *SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130*. J Biol Chem, 2000. **275**(17): p. 12848-56.
92. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
93. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(4): p. 173-83.
94. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochem J, 1994. **300** (Pt 2): p. 281-90.
95. Chalaris, A., et al., *The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(6-7): p. 484-94.
96. Mullberg, J., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. Eur J Immunol, 1993. **23**(2): p. 473-80.

97. Matthews, V., et al., *Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38829-39.
98. Lust, J.A., et al., *Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor*. Cytokine, 1992. **4**(2): p. 96-100.
99. Fischer, M., et al., *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(2): p. 142-5.
100. Serada, S., et al., *IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 9041-6.
101. Dominitzki, S., et al., *Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells*. J Immunol, 2007. **179**(4): p. 2041-5.
102. Hurst, S.M., et al., *Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation*. Immunity, 2001. **14**(6): p. 705-14.
103. Becker, C., et al., *TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 491-501.
104. Ebihara, N., et al., *Role of the IL-6 classic- and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(12): p. 8549-57.
105. McFarland-Mancini, M.M., et al., *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor*. J Immunol, 2010. **184**(12): p. 7219-28.
106. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy*. J Hepatol, 2016.
107. Zhang, H., et al., *IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 1019-31.
108. Panja, A., et al., *The regulation and functional consequence of proinflammatory cytokine binding on human intestinal epithelial cells*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3675-84.

109. Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund, and S. Rose-John, *The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 75-82.
110. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
111. Banerjee, S., et al., *JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects*. Drugs, 2017. **77**(5): p. 521-546.
112. Yu, H., et al., *Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(11): p. 736-46.
113. Leibinger, M., et al., *Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF- and inflammatory stimulation-induced CNS axon regeneration*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e805.
114. Sano, S., et al., *Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4657-68.
115. Yin, S., et al., *Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3*. Am J Pathol, 2011. **178**(4): p. 1614-21.
116. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98**(3): p. 694-702.
117. Sandborn, W.J., et al., *Tofacitinib as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis*. N Engl J Med, 2017. **376**(18): p. 1723-1736.
118. Sandborn, W.J., et al., *Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor, in active ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2012. **367**(7): p. 616-24.
119. Putoczki, T.L., et al., *Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically*. Cancer Cell, 2013. **24**(2): p. 257-71.
120. Nguyen, P.M., T.L. Putoczki, and M. Ernst, *STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease?* J Interferon Cytokine Res, 2015. **35**(5): p. 340-50.

121. Barnes, M.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis*. Immunity, 2009. **31**(3): p. 401-11.
122. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002. **12**(1): p. 9-18.
123. Goncharova, E.A., et al., *PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(2): p. L354-63.
124. Mease, P.J., et al., *The Efficacy and Safety of Clazakizumab, an Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody, in a Phase IIb Study of Adults With Active Psoriatic Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(9): p. 2163-73.
125. Mihara, M., et al., *Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(12): p. 1731-40.
126. Mihara, M., et al., *IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice*. Clin Exp Immunol, 1998. **112**(3): p. 397-402.
127. Takagi, N., et al., *Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(12): p. 2117-21.
128. Lindegaard, H.M., et al., *Doubling the single-dose infusion rate of tocilizumab in rheumatoid arthritis is safe and efficacious*. Scand J Rheumatol, 2016. **45**(4): p. 262-6.
129. Iwai, A., et al., *Short-term add-on tocilizumab and intravenous cyclophosphamide exhibited a remission-inducing effect in a patient with systemic lupus erythematosus with refractory multiorgan involvements including massive pericarditis and glomerulonephritis*. Mod Rheumatol, 2014: p. 1-4.
130. Kamata, Y. and S. Minota, *Successful treatment of massive intractable pericardial effusion in a patient with systemic lupus erythematosus with tocilizumab*. BMJ Case Rep, 2012. **2012**.
131. Danese, S., et al., *Randomised trial and open-label extension study of an anti-interleukin-6 antibody in Crohn's disease (ANDANTE I and II)*. Gut, 2019. **68**(1): p. 40-48.
132. Narazaki, M., et al., *Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130*. Blood, 1993. **82**(4): p. 1120-6.

133. Rabe, B., et al., *Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1021-8.
134. Jostock, T., et al., *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses*. Eur J Biochem, 2001. **268**(1): p. 160-7.
135. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 475-87.
136. Atreya, R., et al., *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 583-8.
137. Richards, P.J., et al., *Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1662-72.
138. Tsantikos, E., et al., *Interleukin-6 trans-signaling exacerbates inflammation and renal pathology in lupus-prone mice*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(10): p. 2691-702.
139. Barkhausen, T., et al., *Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model*. Crit Care Med, 2011. **39**(6): p. 1407-13.
140. Gout, T., A.J. Ostor, and M.K. Nisar, *Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review*. Clin Rheumatol, 2011. **30**(11): p. 1471-4.
141. Sauer, B., *Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(6): p. 2087-96.
142. Madison, B.B., et al., *Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33275-83.
143. Hughes, C.S., L.M. Postovit, and G.A. Lajoie, *Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture*. Proteomics, 2010. **10**(9): p. 1886-90.
144. Reynolds, A., et al., *Canonical Wnt signals combined with suppressed TGFbeta/BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium*. Gut, 2014. **63**(4): p. 610-21.

145. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
146. Rose-John, S., *The soluble interleukin-6 receptor and related proteins*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2015. **29**(5): p. 787-97.
147. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
148. Saxena, S.K., J.S. Thompson, and J.G. Sharp, *Role of epidermal growth factor in intestinal regeneration*. Surgery, 1992. **111**(3): p. 318-25.
149. Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers, *Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system*. Cytokine, 2014. **70**(1): p. 11-20.
150. Date, S. and T. Sato, *Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2015. **31**: p. 269-89.
151. Schmidt, S., et al., *ADAM17 is required for EGF-R-induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling*. J Exp Med, 2018. **215**(4): p. 1205-1225.
152. Kangwan, N., et al., *Sonic hedgehog inhibitors prevent colitis-associated cancer via orchestrated mechanisms of IL-6/gp130 inhibition, 15-PGDH induction, Bcl-2 abrogation, and tumorsphere inhibition*. Oncotarget, 2016. **7**(7): p. 7667-82.
153. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
154. Luig, M., et al., *Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(7): p. 1597-607.
155. Chebath, J., et al., *Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities*. Eur Cytokine Netw, 1997. **8**(4): p. 359-65.
156. Martz, E. and M.S. Steinberg, *The role of cell-cell contact in "contact" inhibition of cell division: a review and new evidence*. J Cell Physiol, 1972. **79**(2): p. 189-210.
157. Puliafito, A., et al., *Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(3): p. 739-44.
158. Krueger, J., et al., *Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells*. J Cell Biochem, 1991. **45**(4): p. 327-34.

159. Rokavec, M., et al., *IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis*. J Clin Invest, 2014. **124**(4): p. 1853-67.
160. Arab-Bafrani, Z., et al., *Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells*. J Med Signals Sens, 2016. **6**(2): p. 112-6.
161. Lehner, B., et al., *The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival*. Cell Tissue Res, 2011. **345**(3): p. 313-28.
162. Nishimoto, N. and T. Kishimoto, *Humanized antihuman IL-6 receptor antibody, tocilizumab*. Handb Exp Pharmacol, 2008(181): p. 151-60.
163. Fukada, T., et al., *Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis*. Immunity, 1996. **5**(5): p. 449-60.
164. Bu, L.L., et al., *Inhibition of STAT3 reduces proliferation and invasion in salivary gland adenoid cystic carcinoma*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(5): p. 1751-61.
165. Gurbuz, V., et al., *Effects of AG490 and S3I-201 on regulation of the JAK/STAT3 signaling pathway in relation to angiogenesis in TRAIL-resistant prostate cancer cells*. Oncol Lett, 2014. **7**(3): p. 755-763.
166. Rosen, M.J., et al., *STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2224-34.
167. Li, P., et al., *Effects of ephrinB2 gene siRNA on the biological behavior of human colorectal cancer cells*. Oncol Rep, 2015. **33**(2): p. 758-66.
168. Zhou, Y., et al., *Placental growth factor enhances angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells via PI3K/Akt pathway: Potential implications of inflammation bowel disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **470**(4): p. 967-74.
169. Gupta, J., et al., *Pharmacological inhibition of p38 MAPK reduces tumor growth in patient-derived xenografts from colon tumors*. Oncotarget, 2015. **6**(11): p. 8539-51.
170. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.

171. Taniguchi, K., et al., *A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration*. Nature, 2015. **519**(7541): p. 57-62.
172. Meng, Z., T. Moroishi, and K.L. Guan, *Mechanisms of Hippo pathway regulation*. Genes Dev, 2016. **30**(1): p. 1-17.
173. Avruch, J., D. Zhou, and N. Bardeesy, *YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation*. Cell Cycle, 2012. **11**(6): p. 1090-6.
174. Tebbutt, N.C., et al., *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1089-97.
175. Rakemann, T., et al., *The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1257-66.
176. Hu, B., et al., *Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(24): p. 9862-7.
177. Aden, K., et al., *Classic IL-6R signalling is dispensable for intestinal epithelial proliferation and repair*. Oncogenesis, 2016. **5**(11): p. e270.
178. Yan, I., et al., *ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6 α from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses*. J Leukoc Biol, 2015.
179. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3460-3470.
180. Aden, K., et al., *ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING*. J Exp Med, 2018. **215**(11): p. 2868-2886.

7 Anhang

7.1.1 Liste verwendeter Abkürzungen

ADAM	<i>ADAM metalloproteinase domain</i>
AKT	<i>protein kinase B</i>
AOM	Azoxymethan
ATG-16L1	<i>autophagy-related protein 16-1</i>
ATF4	<i>activation factor 4</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
CDH1	Cadherin-1 = E-Cadherin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
Δ IEC	<i>deleted in intestinal epithelial cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
eIF2a	<i>eukaryotic translation initiation factor 2A</i>
Cre	<i>cyclization recombination</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DSS	Natrium-Dextransulfat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EMT	Epitheliale-zu-mesenchymale-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FCS	<i>fetal calf serum</i>
flox	<i>flanked by loxP</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRP94	<i>glucose regulated protein 94</i>
gp130	Glykoprotein 130
GWAS	Genom-weite Assoziationsstudie
hIL-6	hyper-IL-6
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFX	Infliximab
IgG	Immunglobulin-G
IL	Interleukin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-6R	IL-6-Rezeptor
IL-11	Interleukin-11
IL-27	Interleukin-27
IRE1	<i>inositol-requiring enzyme 1</i>
iSTAT3	STAT3-Inhibition
Jak	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
loxP	<i>locus of X-over P1</i>
MAPK	MAP-Kinase
mIL-6R	membrangebundener IL-6-Rezeptor
MMP	Magermilchpulver
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOD2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
OMP	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PERK	<i>protein kinase like ER kinase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PRP	<i>pattern recognition particle</i>
pSTAT	phosphoryliertes STAT
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RNA	Ribonukleinsäure
reg3	<i>regeneration islet-derived 3</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sgp130	<i>soluble gp130</i>
sgp130Fc	<i>soluble gp130 linked to Fc domain of IgG1</i>
SHP2	<i>protein-tyrosine phosphatase 2C</i>
sIL-6R	löslicher IL-6-Rezeptor
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
sXBP1	<i>spliced XBP1</i>
TCZ	Tocilizumab
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TM	Tunicamycin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TTBS	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
XBP1	<i>x-box binding protein 1</i>
YAP	<i>yes-associated protein</i>

7.1.2 Liste der Abbildungen

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Unfolded Protein Response	6
Abbildung 1.2:	Classic und Trans-Signaling von IL-6	10
Abbildung 1.3:	Shedding des membranständigen IL-6 Rezeptors erzeugt den löslichen IL-6R	11
Abbildung 1.4:	Aktivierung der STAT3-Kinase durch IL-6-Signale	12
Abbildung 2.1:	Prinzip eines Wundheilungs-Assays	24
Abbildung 3.1:	Zeitkinetik der IL-6- und hIL-6-vermittelten STAT3-Phosphorylierung in HT-29	33
Abbildung 3.2:	Induktion von <i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i> in Kolonkarzinomzellen	34
Abbildung 3.3:	Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Effekt von IL-6, hIL-6 und EGF auf die epitheliale Wundheilung.....	35
Abbildung 3.4:	Zeitabhängiges Wachstum von Kolonkarzinomzellen und EMT	37
Abbildung 3.5:	Dosis-abhängige Inhibition der IL-6 Signalwege mit monoklonalen Antikörpern	39
Abbildung 3.6:	Inhibition der durch hIL-6 induzierten Wundheilung mittels sgp130Fc	40
Abbildung 3.7:	Einfluss von STAT3-induzierenden Zytokinen auf die epitheliale Wundheilung	41
Abbildung 3.8:	Einfluss von STAT3-Inhibition auf die epitheliale Wundheilung.....	42
Abbildung 3.9:	Basale Phänotypisierung von IL-6R ^{ΔIEC}	45
Abbildung 3.10:	Expression von STAT3-Genen in Organoiden aus Dünndarmkrypten	47
Abbildung 3.11:	Expression von UPR-Genen nach Induktion von <i>Classic</i> und <i>Trans-Signaling</i>	49
Abbildung 3.12:	Epitheliale Wundheilung nach simultaner Induktion von <i>Classic</i> bzw. <i>Trans-Signaling</i> und ER-Stress	50
Abbildung 3.13:	Epitheliale Wundheilung nach repetitiver Induktion von <i>Trans-Signaling</i> und ER-Stress	51
Abbildung 3.14:	Expression von UPR-Genen nach repetitiver Induktion von <i>Trans-Signaling</i>	52

Abbildung 3.15: Epitheliale Wundheilung nach simultaner repetitiver Induktion von <i>Classic Signaling</i> und ER-Stress	53
Abbildung 3.16: Expression von UPR-Genen nach repetitiver Induktion von <i>Classic Signaling</i>	55
Abbildung 3.17: Epitheliale Wundheilung nach Hemmung der IL-6-Signalwege und ER-Stress.....	56

7.1.3 Liste der Tabellen

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Methoden.....	18
Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Zelllinien	18
Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Zellkulturformate	20
Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Lysepuffer	20
Tabelle 2.5: Verwendete Zellmenge für Stimulationsansätze	23
Tabelle 2.6: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese	26
Tabelle 2.7: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele	29
Tabelle 3.1: Induzierbarkeit der IL-6-Signalwege im intestinalen Epithel von IL-6R ^{flox} - und IL-6R ^{ΔIEC} -Mäusen mittels Applikation von IL-6	44
Tabelle 3.2: Induzierbarkeit der IL-6-Signalwege in Zellkulturen mit murinen intestinalen Epithelzellen extrahiert aus IL-6R ^{flox} - und IL-6R ^{ΔIEC} -Mäusen mittels Applikation von IL-6	44
Tabelle 7.1.1: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen	94
Tabelle 7.1.2: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Zellmedien.....	94
Tabelle 7.1.3: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Mauslinie	95
Tabelle 7.1.4: Liste der verwendeten Chemikalien	95
Tabelle 7.1.5: Liste der verwendeten Stimulanzen und Inhibitoren.....	96
Tabelle 7.1.6: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	97
Tabelle 7.1.7: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper	97
Tabelle 7.1.8: Bezeichnung der verwendeten Kits.....	97
Tabelle 7.1.9: Liste der verwendeten Oligonukleotide und Sequenzen	98
Tabelle 7.1.10: Liste der verwendeten TaqMan-Sonden	98
Tabelle 7.1.11: Liste der verwendeten Geräte	99
Tabelle 7.1.12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	100

7.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7.1.1: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x DLB	20mM Tris (pH 7,4), 2% (v/v) SDS
4x Trenngelpuffer	1,5M Tris (pH 8,8), 0,4% (v/v) SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5M Tris (pH 6,8), 0,4% (v/v) SDS
5x SDS	250mM Tris (pH 6,8), 10% SDS (w/v), 50% (v/v) Glycerol, 500mM DTT, 500mM Bromphenolblau
Amersham ECL	GE Healthcare, Freiburg
Amersham ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg
Anodenpuffer 1	30mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Kathodenpuffer	25mM Tris, 40mM 6-Aminocaprinsäure, 20% (v/v) Methanol
Laufpuffer	1x TGS (Bio-Rad)
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5mM Tris (pH 6,8), 2% (v/v) SDS
TTBS	20mM Tris, 137mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20

7.1.5 Zellmedien

Tabelle 7.1.2: Bezeichnung und Zusammensetzung verwendeter Zellmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM + 10 % FCS	DMEM + 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, 25mM HEPES, 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Medium für murine Zellen, Organoide	435 ml Advanced DMEM/F12 + 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) NEAA, 10mM HEPES, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
RPMI + 10 % FCS	RPMI + 10% (v/v) FCS, 1% (w/v) Glutamin, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Vorverdauungslösung für intestinale Epithelzellen	1xHBSS, 5% (v/v) FCS, 5mM EDTA, 1mM DTT

7.1.6 Mauslinie

Tabelle 7.1.3: Bezeichnung und Herkunft der verwendeten Mauslinie

Bezeichnung	Herkunft
IL-6R VillinCre	Genoway, Lyon, Frankreich

7.1.7 Chemikalien

Tabelle 7.1.4: Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid, Bisacrylamid-Lösung 30% (w/v)	Bio-Rad, München
Agarose	Biozyme, Hessisch Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
BD Matrigel™ Basement Membran Matrix	BD, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
ATL-Puffer	Qiagen, Hilden
DEPC behandeltes H ₂ O	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dithiothreitol (DTT)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
dNTPs	Thermo Scientific, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Serum (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare, Freiburg
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Maxima H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Bremen
Magermilchpulver (MMP)	Bio-Rad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphatase Inhibitor Cocktail II (100 x)	Sigma-Aldrich, München

Protease Inhibitor (100 x)	Sigma-Aldrich, München
Proteinase K	Qiagen, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
SmartLadder DNA marker	Eurogentec, Köln
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
TRIS	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA (1x)	Invitrogen, Karlsruhe

7.1.8 Stimulanzen und Inhibitoren

Tabelle 7.1.5: Liste der verwendeten Stimulanzen und Inhibitoren

Bezeichnung	Hersteller
Humanes Interleukin-6	PeproTech, Hamburg
Humanes IL-11	PeproTech, Hamburg
Humanes IL-22	PeproTech, Hamburg
Humanes EGF	R&D Systems GmbH
Hyper-IL-6	Institut für Biochemie, Kiel
Murines EGF	Biosource Invitrogen, Karlsruhe
Murines IL-6	PeproTech, Hamburg
Murines IL-22	PeproTech, Hamburg
Murines Noggin	R&D Systems GmbH
Murines R-Spondin-1	R&D Systems GmbH
Tocilizumab	Roche, Basel
Infliximab	MSD, Haar
Sgp130Fc	Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel
Tunicamycin (TM)	Calbiochem, Darmstadt

7.1.9 Antikörper

Tabelle 7.1.6: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
β-Aktin	Maus, polyklonal	1:10000 in MMP	Sigma-Aldrich, München	A-5441
pSTAT3	Kaninchen, polyklonal	1:1000 in BSA	Cell Signaling Technology®, Leiden, Niederlande	9131
STAT3	Kaninchen, polyklonal	1: 1000 in BSA	Cell Signaling Technology®, Leiden, Niederlande	9132

Tabelle 7.1.7: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Maus HRP	1:1000	Amersham Biosciences, Glattbrugg, Schweiz	NA931V
Kaninchen HRP	1:1000	Amersham Biosciences, Glattbrugg, Schweiz	NA934V

7.1.10 Kits

Tabelle 7.1.8: Bezeichnung der verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Lamina Propria Dissociation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Bremen
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SYBR® Select Master Mix	Life Technologies, Darmstadt

7.1.11 Oligonukleotide

Tabelle 7.1.9: Liste der verwendeten Oligonukleotide und Sequenzen

Zielgen	Spezies	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
Chop	Maus	CTGCCTTTCACCTTGGAGA	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
Gapdh	Maus	CCGGGGCTGGCATT- GCTCTCA	CTTGCTCAGTGTCTT- GCTGGGG
Grp94	Maus	TGGGTCAAGCAGAAAGGAGG	TCTCTGTTGCTTCCCGACTTT
Reg3 γ	Maus	CAGACAAGATGCTTCCCCGT	GCAACTTCACCTTGCACCTG
Socs3	Maus	CCTTTGACAAGCGGACTCTC	GCCAGCATAAAAACCCTTCA
Xbp1 <i>ge-splicet</i>	Maus	CTGAGTCCGAATCA- GGTGCAG	CTCTGGGGAAGGACATTTGA
Xbp1total	Maus	TGGCCGGGTCTGCTGAGT	ACAGGGTCCAACCTTGTCCAG
ATF4	Mensch	ATATGACCTGGAAATCATGC	AGGGATCATGGCAACGTAAG
CHOP	Mensch	AGCAGAGGTCACAAGCACCT	TTCATGCTTGGTGCAGATTC
GAPDH	Mensch	GGCATGGCCTTCCGTGTCCC	TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG
GRP94	Mensch	TGCCAAGGAAGGAGTGAAGT	GTTGCCAGACCATCCGTACT
SOCS3	Mensch	CACCTTTCTGATCCGCGACA	CGGAGGAGGGTTCAGTAGGT
XPB1 <i>ge-splicet</i>	Mensch	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG
XPB1total	Mensch	CCTGGTTGCTGAAGAGGAGG	CCATGGGGAGATGTTCTGGAG

Tabelle 7.1.10: Liste der verwendeten *TaqMan*-Sonden

Zielgen	Spezies	Hersteller	Katalognummer
Reg3 β	Maus	Life technologies, Darmstadt	00440616
Reg3 γ	Maus	Life technologies, Darmstadt	00441127
Socs3	Maus	Life technologies, Darmstadt	00545913

7.1.12 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7.1.11: Liste der verwendeten Geräte

Bezeichnung	Hersteller
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
96-well Thermocycler	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Analytische Waage 870-15	Kern, Balingen
Automatische Entwicklertaschine	AGFA, Mortsel, Belgien
Cellometer® Auto T4 Plus Zellzähler	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Eppendorf Research® Manuelle Pipetten	Eppendorf, Hamburg
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Lichtmikroskop, AxioImager Z1	Zeiss, Oberkochen
Mini-Zentrifuge SPROUT	Heathrow Scientific, Nottingham, United Kingdom
Inkubator für Zelllinien	Binder, Tuttlingen
Inversmikroskop h500	Hund, Wetzlar
Plattenlesegerät: Tecan Infinite® F200 Pro	Tecan, Männedorf
Sicherheitswerkbank Herasafe™ KS	Thermo Scientific, Bremen
Thermomixer compact 5350	Eppendorf, Hamburg
TissueLyser II	Qiagen, Hilden
Tube roller SRT6	Stuart Equipment, Staffordshire, United Kingdom
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
UV-Spektralphotometer: NanoDrop™ ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Vortex-Genie 2 Variable Speed	Sartorius, Göttingen
Wasserbad 1003	GFL, Burgwedel
Wasserreinigungssystem	TKA, Niederelbert
Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Spitzbodenröhrchen: Megafuge 16R	Thermo Scientific, Bremen
Zentrifuge für 1 ml und 2 ml Reaktionsgefäße: Fresco 21	Thermo Scientific, Bremen

Tabelle 7.1.12: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
0,5 ml, 1 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml und 15 ml Spitzbodenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
650 ml Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Blot Filterpapier	Bio-Rad, München
Chemilumineszenz Röntgenfilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
MicroAmp 384-well Reaktionsplatten	Applied Biosystems/Life Technologies, Darmstadt
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen	Bio-Rad, München
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zählkammern für Cellometer®	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg

7.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Philip Rosenstiel für die Möglichkeit bedanken, meine Promotion unter seiner Betreuung durchführen zu können. Insbesondere die Gelegenheit, mein Projekt während jeder Entwicklungsphase vorstellen und diskutieren zu können, die praktischen Ratschläge und die konstruktive Kritik bei der Korrekturlesung haben mir sehr geholfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Konrad Aden für die kompetente und motivierende Betreuung bedanken, die Einarbeitung im Labor, den wissenschaftlichen Austausch und schließlich für die Durchsicht und Korrektur der Dissertation. Insbesondere seine Freude an der Wissenschaft und die fachliche Expertise waren mir stets ein Vorbild und haben mir bei der Durchführung des Projektes sehr geholfen.

Ich möchte mich außerdem beim Graduiertenkolleg „Genes, Environment and Inflammation“ bedanken, deren finanzielle und ideelle Unterstützung das Fundament für die Realisierung meiner Promotion gebildet haben.

Der Arbeitsgruppe Zellbiologie möchte ich für ihren wissenschaftlichen Input und die konstruktiven Diskussionen nach den Vorträgen danken, außerdem für den freundschaftlichen Umgang innerhalb der Gruppe. Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Florian Tran, der mir nicht nur bei der Einarbeitung im Labor eine große Unterstützung war, sondern mir auch in den folgenden Jahren immer als guter Freund mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei den technischen Assistenten unserer Arbeitsgruppe bedanken, namentlich Katharina Goebel, Karina Greve, Dorina Oelsner, Tanja Klostermeier, Sabine Kock, Maren Reffeltmann und Tatjana Schmidtke, die mir mit ihrem technischen Sachverstand bei der Durchführung der Experimente eine unschätzbare Hilfe waren.

Zudem danke ich Prof. Dr. Rose-John und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Biochemie in Kiel dafür, dass sie mir ihr selbst produziertes hyper-IL-6 zur Verfügung gestellt haben.

Abschließend richtet sich ein großes Dankeschön an meine Eltern, meine Schwester und an Corentin, deren unermüdliche Unterstützung und stete Ermutigung mich über die Jahre hinweg im Labor und am Schreibtisch begleitet haben. Insbesondere meiner Mutter bin ich für das Korrekturlesen und ihre bedingungslose Unterstützung zutiefst dankbar.

7.3 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Alexandra Le Mao, geb. Breuer

Geburtsdatum: 05.02.1992

E-Mail: alexandra.lemao52@gmail.com

Geburtsort: Kiel

ARBEITSERFAHRUNG

Seit 04/2018	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel Facharztweiterbildung im Fach Innere Medizin Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
07/2017 – 10/2017	Friedrich-Ebert-Krankenhaus, Neumünster Praktisches Jahr: Innere Medizin
05/2017 – 07/2017	Westküsten-Klinikum, Heide Praktisches Jahr: Unfall- und Viszeralchirurgie
03/2017 – 05/2017	Centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand, Frankreich Praktisches Jahr: Herz- und Unfallchirurgie
11/2016 – 03/2017	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel Praktisches Jahr: Wahlfach Gynäkologie und Geburtshilfe

STUDIUM/ AUSBILDUNG

10/2010 – 12/2017	Medizinstudium, Christian-Albrechts-Universität, Kiel Gesamtnote: 1,5 (sehr gut) 1. Staatsexamen am 04.09.2012 – Note: 1,5 (sehr gut) 2. Staatsexamen am 13.10.2016 – Note: 1 (sehr gut) 3. Staatsexamen am 29.11.2017 – Note: 2 (gut)
06/2010	Allgemeine Hochschulreife, Kieler Gelehrtenschule, Kiel Note: 1,2 (sehr gut)

STIPENDIEN

04/2014 – 03/2015	Stipendium im Graduiertenkolleg „genes, environment, inflammation“
03/2013 – 12/2017	Stipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT UND PUBLIKATIONEN

Seit 04/2014	Institut für klinische Molekularbiologie, Kiel Experimentelle Forschungsarbeit zur medizinischen Promotion AG Zellbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Philip Rosenstiel Mitgliedschaft im Graduiertenkolleg „genes, environment, inflammation“ Mitgliedschaft im Exzellenzcluster „Inflammation at interfaces“
---------------------	---

- 11/2016 ***Classic IL-6R signalling is dispensable for intestinal epithelial proliferation and repair (Oncogenesis, 2015. 5(11): p. e270)***
Aden K, **Breuer A**, Rehman A, Geese H, Tran F, Sommer J, Waetzig GH, Reinheimer TM, Schreiber S, Rose-John S, Scheller J, Rosenstiel P
- 08/2016 ***Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation (Cell Reports, 2016. 16: p. 2208-2218)***
Aden K, Rehman A, Falk-Paulsen M, Secher T, Kuiper J, Tran F, Pfeuffer S, Sheibani-Tezerji R, **Breuer A**, Luzius A, Jentzsch M, Häsler R, Billmann-Born S, Will O, Lipinski S, Bharti R, Adolph T, Iovanna JL, Kempster SL, Blumberg RS, Schreiber S, Becher B, Chamaillard M, Kaser A, Rosenstiel P.

AUSLANDSAUFENTHALTE

- 03/2017 – 05/2017 **Centre hospitalier universitaire de Clermont-Ferrand, Frankreich**
Praktisches Jahr Chirurgie (2 Monate)
- 09/2015 – 02/2016 **Centre hospitalier universitaire de Dijon, Frankreich**
Auslandssemester mit Erasmus+-Austauschprogramm (6 Monate)
- 08/2013 **Sprachinstitut Eurocentres, La Rochelle, Frankreich**
Sprachkurs (3 Wochen)
- 02/2008 – 07/2008 **St. Hilda's Collegiate School, Dunedin, Neuseeland**
Auslandsschulaufenthalt (5 Monate)

SOZIALE TÄTIGKEITEN

- 04/2014 – 03/2015 Studentische Vertretung im Studienausschuss der Medizinischen Fakultät
- 07/2013 – 06/2014 Stellvertretendes Mitglied im Konvent der Medizinischen Fakultät
- 05/2012 – 07/2015 Studentische Vertretung der Medizinischen Fachschaft

SONSTIGE QUALIFIKATIONEN

EDV: MS Office, Graph Pad, EndNote

SPRACHEN: Deutsch: Muttersprache Englisch: fließend
Französisch: fließend Latein: großes Latinum

SCHULUNGEN: Advanced Life Support 2016, Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung 2014